Untersuchungen zur Mikromorphologie von Babesia canis und Babesia gibsoni im Blut experimentell infizierter Hunde

Elke Mundt

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547009_0030

Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin
und Parasitologie der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr.h.c. J. Boch

Untersuchungen zur Mikromorphologie von Babesia canis und Babesia gibsoni im Blut experimentell infizierter Hunde

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Elke Mundt
aus
Cuxhaven

München 1979

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. H. Kräußlich
Referent:	Prof. Dr. Dr.h.c. J. Boch
Korreferent:	Priv.-Doz. Dr. H.-G. Liebich

Tag der Promotion: 27. Juli 1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS– UND FOTODRUCK FRANK
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Meinen lieben Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Biologie und Pathogenität von Babesia canis und Babesia gibsoni sowie die Ultrastruktur von Babesien (anhand der Literatur)	2
III.	Eigene Untersuchungen	10
	A. Material und Methoden	10
	B. Ergebnisse	13
	1. Klinische Beobachtungen und Parasitämieverlauf	13
	2. Elektronenmikroskopische Befunde . . .	15
IV.	Besprechung der Ergebnisse	33
V.	Zusammenfassung	42
	Summary	43
VI.	Literaturverzeichnis	44
	Lebenslauf	

I. Einleitung

In letzter Zeit treten bei Hunden in Deutschland immer häufiger akute Babesiosen auf. Meistens handelt es sich bei den Patienten um Tiere, die im benachbarten Ausland (Südfrankreich, Schweiz und Italien) waren. Als Erreger wird Babesia canis diagnostiziert. Dagegen kommt die zweite Hundebabesie (Babesia gibsoni) in Europa bisher nicht vor.

Beide Arten unterscheiden sich morphologisch grundlegend. Ultrastrukturelle Untersuchungen wurden bisher nur in sehr begrenztem Ausmaß durchgeführt.

Mit der vorliegenden Arbeit sollen die zytomorphologischen Unterschiede der beiden Hundebabesienarten dargestellt werden. Dabei wurden verschiedene Präparationsverfahren angewendet.

II. Biologie und Pathogenität von Babesia canis und Babesia gibsoni sowie die Ultrastruktur von Babesien (anhand der Literatur)

Babesia canis wird erstmalig beschrieben von PIANA und GALLI-VALERIO (1895 unter dem Namen Pyrosoma bigeminum var. canis. PATTON (1910) fand in Indie im Blut von Jagdhunden und später im Blut eines Schakals Gebilde, die sich in ihrem Aussehen deutlich von der bis dahin bekannten Hundebabesie unterschieden. Er nennt sie Piroplasma gibsoni.

Nach Klassifizierungsschwierigkeiten, die sich über rund 40 Jahre hinzogen werden die Babesien seit dem 3. Internationalen Kongress für Protozoologie in Leningrad 1969 dem Unterstamm Apicomplexa Levine 1970, Klasse Piroplasmea zugerechnet (LEVINE, 1971).

Die Übertragung der Babesien erfolgt durch verschiedene Zeckenarten. Rhipicephalus sanguineus wurde von ROKEY und RUSSELL (1961) auf einem an Babesia canis erkrankten Hund gefunden. SHORTT (1973) gelang die experimentelle Übertragung von Babesia canis mit der gleichen Zeckenart, während REUSSE (1954) Haemaphysalis leachi im Experiment mit Erfolg verwendete. Auch Dermacentor reticulatus wird als Vektor beschrieben (REGENDANZ und REICHENOW, 1933; GILOT, 1974; AESCHLIMANN, BROSSARD und QUENET, 1975), nicht dagegen die bei uns heimische Zecke Ixodes ricinus (BAILENGER und JAMIN, 1968). Babesia gibsoni wird durch Haemaphysalis bispinosa (RAO, 1927) und Rhipicephalus sanguineus (GROVES und YAP, 1968) übertragen.

Die Babesien werden in der Zecke sowohl von der Larve zur Nymphe als auch von der Nymphe zur adulten Zecke und transovariell übertragen (SHORTT, 1973; FRIEDHOFF, 1978). Auf diese Art kann der Parasit nach BRUMPT (1938) über 7 Vektorgenerationen, ohne Zwischenschaltung eines Endwirtes, vital und reproduktionsfähig bleiben.

Die Vermehrung der Babesien findet sowohl in der Zecke als auch im Säugetier statt. Die Vermehrungsvorgänge in der Zecke sind noch nicht endgültig geklärt. FRIEDHOFF und BÜSCHER (1976) nehmen an, daß nach Aufnahme von

infiziertem Blut im Zeckendarm eine geschlechtliche Vermehrung stattfindet, ähnlich wie es von MEHLHORN und SCHEIN (1976, 1977) sowie MEHLHORN, SCHEIN und WARNECKE (1978) an Theilerien beschrieben wird. Sie behaupten, daß die früher als Koch'sche Strahlenkörper (KOCH, 1906) bekannten Formen Gamogoniestadien sind. Nach Syngamie entstehen Ookineten, ehemals als Vermicula bezeichnet, die aus dem Darmepithel in die Hämolymphe wandern und von dort aus in verschiedene Körpergewebe, wie Muskeln, Malpighische Gefäße und Ovarien gelangen. Bei der Eiablage werden sie transovariell weitergegeben. Aus den Eiern entwickeln sich infizierte Zeckenlarven, welche als Adulte in ihren Speicheldrüsen die Parasiten beherbergen. Durch das Blutsaugen am Wirt werden die Babesien aktiviert und vermehren sich durch Sporogonie (SCHEIN, MEHLHORN und VOIGT, 1979). Dabei werden bis zu 600 Sporozoiten in einer Speicheldrüsenzelle gefunden (FRIEDHOFF, SCHULTYSECK und WEBER, 1972). Diese werden mit dem Speichel auf den Säugetierwirt übertragen. POTGIETER und ELS (1977b) hingegen konnten bei licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen keine geschlechtlichen Formen in der Zecke nachweisen. Sie fanden in Darmepithelien und anderen Geweben primäre Schizonten, aus denen große Merozoiten frei werden. Nach ihrer Ansicht findet dann in der Speicheldrüse eine sekundäre Schizogonie statt, wobei kleine Merozoiten entstehen, die für das Säugetier infektiös sind.

Im Erythrozyten vermehren sich die Babesien durch Knospung oder Zweiteilung. Nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen von RUDZINSKA und TRAGER (1974b) an Babesia microti treten als erstes Anzeichen der Merozoitenbildung Doppelmembran-Segmente unter dem Plasmalemma auf, wodurch dieses hervorgewölbt wird. Von der Mutterzelle her wandern die anderen Zellbestandteile, wie Kern und endoplasmatisches Retikulum sowie Rhoptrien und Mikronemen ein oder werden im jungen Merozoiten selbst gebildet. Schließlich wird die Knospe abgeschnürt und die Tochterzelle ist selbständig.

GÖBEL, PATZIG und KRAMPITZ (1978) beobachten bei Babesia microti-Stämmen ein davon abweichendes Verhalten. Zwischen Mutter- und Tochterzelle bildet sich eine Brücke aus erweitertem endoplasmatischen Retikulum. Nach

Ausdifferenzierung der Zellorganellen im Merozoiten dilatiert das endoplasmatische Retikulum bis zu Vesikelgröße und bleibt nach vollkommener Auflösung der Mutterzelle als "Restkörper" in der Wirtszelle liegen.

Quantitative Untersuchungen über das Vorkommen und die klinische Bedeutung der Hundebabesien liegen nicht vor. Immerhin gibt es eine große Anzahl von Publikationen über die Klinik von Babesia canis in den USA (Lit. bei EWING, 1963). Auch in den Tropen ist Babesia canis verbreitet, wie aus den Berichten von PURCHASE (1947) in Kenia und BOTROS, MOCH und BARSOUM (1973) in Ägypten hervorgeht. Neuere Beschreibungen des Erregers und der durch ihn verursachten Krankheit kommen aus Australien (HILL und BOLTON, 1966). Bei den Berichten aus Frankreich, Spanien und der Schweiz von JACQUIER (1967, 1973 und 1974) handelt es sich im wesentlichen um das Gebiet des Genfer Sees. Bodenständige Babesiosen in Deutschland sind nicht bekannt. Die von GEYER und RATHELBECK (1976) beschriebenen Fälle sowie die zahlreichen persönlichen Mitteilungen von Kleintierpraktikern betreffen Hunde, die sich in Frankreich, Marokko und Sardinien infiziert haben. Eingeschleppte Fälle wurden auch in Dänemark (WILLEBERG und KJAERSGAARD, 1973) und in den Niederlanden (LEEFLANG, 1971) beobachtet.

Die Inkubationszeit der durch Babesia canis hervorgerufenen Krankheit beträgt bei Infektion durch Zeckenbiß 10-21 Tage (LEVINE, 1973). Die Erkrankung hat einen akuten oder chronischen Verlauf. Die akute Form ist durch Fieber und Anorexie gekennzeichnet. Durch Zerstörung der Erythrozyten wird eine Anämie hervorgerufen; Ikterus und Hämoglobinurie können als Folge davon auftreten. Bei der chronischen Form kommt es zu einer geringgradigen Anämie mit nachfolgender Selbstheilung oder zu einer fortschreitenden Anämie mit Abmagerung, Ikterus, Splenomegalie und rezidivierender Hämoglobinurie (ALPERIN und BEVINS, 1963). MAEGRAITH, GILLES und DEVAKUL (1957) beobachten bei experimentell infizierten Hunden zusätzlich eine verstärkte Atmung mit Austritt von schaumig-blutigem Speichel. Bei der Sektion stellen sie ein massives

Lungenödem fest. Starker Husten mit Laryngitis und Tonsillitis tritt auch bei natürlich infizierten Hunden auf (ROKEY und RUSSEL, 1961; JACQUIER, 1973). Gelegentliche cerebrale Störungen äußern sich in Form von Ataxien, Nachhandschwäche (REUSSE, 1954; CRESTIAN und CLERC, 1974) und tonisch-klonischen Krämpfen (ROKEY und RUSSELL, 1961). PURCHASE (1947) weist bei histologischen Untersuchungen zahlreiche Babesien in den Hirnkapillaren nach. In einigen Fällen treten Durchfall und starker Durst auf (MERENDA, 1939; GROGAN, 1953; JACQUIER, 1973). Eine Nierenschädigung führt zu Urämie; Bilirubin, Protein und Blut sind im Harn nachweisbar (REUSSE, 1954; MAEGRAITH, GILLES und DEVAKUL, 1957). JACQUIER (1967) beobachtet schmerzhaften Harnabsatz. Durch die Anämie wird eine Herzinsuffizienz mit Ödembildung in Unterhaut und Lunge hervorgerufen (GEYER und RATHELBECK, 1976). MAEGRAITH, GILLES und DEVAKUL (1957) beobachten bei infizierten Hunden Leberschmerz, als dessen Ursache GEYER und RATHELBECK (1976) eine Leberverfettung diagnostizieren. Weiterhin können als klinische Anzeichen von Babesiose Konjunktivitis, Keratitis und Iridocyclitis auftreten (CRESTIAN und CLERC, 1974).

Im Gegensatz zu Babesia canis kommt Babesia gibsoni in Europa nicht vor, auch fehlen bodenständige Infektionen in den USA. Weit verbreitet ist der Erreger in Asien (PATTON, 1910; SYMONS, 1972; GROVES und YAP, 1968) und Afrika (MARONPOT und GUINDY, 1970). Empfänglich sind neben dem Haushund Schakal (PATTON, 1910), Fuchs (MARONPOT und GUINDY, 1970), Wolf (YAKIMOFF und SCHOKHOR, 1917) und Fennek (LEGER und BEDIER, 1922). Die Inkubationszeit beträgt 10-22 Tage (GROVES und DENNIS, 1972). Das klinische Erscheinungsbild entspricht dem von Babesia canis (FOWLER und Mitarb., 1972). Aber Ikterus (GROVES und YAP, 1968) und Hämoglobinurie (PATTON, 1910) treten nicht auf und die Nieren werden nicht befallen (RAO, 1927).

Die geschilderten Organveränderungen beider Hundebabesiosen entstehen durch Sauerstoffmangel infolge Anämie. Dabei kommt es zu Herzschwäche und Kreislaufstörungen. Diese haben eine erhöhte Durchlässigkeit der Gefäßwände zur Folge, wodurch Blutextravasate auftreten.

Schließlich tritt der Tod durch mangelhafte Sauerstoffversorgung aller Organe (REUSSE, 1954) oder durch Schock ein (MAEGRAITH, GILLES und DEVAKUL, 1957). Bei jungen Hunden verläuft die Babesien-Erkrankung heftiger als bei ausgewachsenen Tieren (CIUCA, 1912; REUSSE, 1954; HILL und BOLTON, 1966).

Licht- und elektronenmikroskopisch werden Babesien intra- und extrazellulär gefunden (GÖBEL, 1976). Die Größe von Babesia canis beträgt 2-4 µm (BÜTTNER, 1968). Trophozoiten (=Mutterzellen) haben eine runde bis amöboide Form, Merozoiten (=Tochterzellen) sind oval bis birnenförmig (FRIEDHOFF und SCHOLTYSECK, 1969). Es befinden sich bis zu 12 Merozoiten in einem Erythrozyten (FRIEDHOFF und LIEBISCH, 1978). Auch Vorstufen von Erythrozyten können, besonders bei hoher Parasitämie, von Babesien befallen sein. Babesia gibsoni mißt im Gegensatz zu Babesia canis nur 1,0-3,5 µm (GROVES und DENNIS, 1972). Von ihr können bis zu 5 Parasiten in einem Erythrozyten liegen (BÜTTNER, 1968). Sie sind meist rundlich, weisen jedoch sehr selten auch die für Babesia canis typische piriforme Gestalt auf (FOWLER, RUFF und HORNOF, 1970).

FLEWETT und FULTON (1959) waren die ersten, welche die Ultrastruktur von Babesien an Babesia rodhaini untersuchten. Dabei stellten sie eine große Ähnlichkeit zwischen Babesien und Plasmodien fest. Die äußere Membran des Parasiten besteht bei den Trophozoiten aus einer Elementarmembran. Bei Merozoiten liegt unter dem Plasmalemma eine zusätzliche mehrfach unterbrochene innere Membran. Diese besteht aus zwei miteinander verbundenen Elementarmembranen (BÜTTNER, 1968). An den Unterbrechungsstellen laufen sie zusammen und bilden eine Lamelle oder eine sehr flache Zisterne (RUDZINSKA und TRAGER, 1974a).

Mit der Gefrierätzmethode weisen KREIER und Mitarb. (1975) an Babesia microti sowie GÖBEL (1976) an Merozoiten von Babesia musculi (syn. muratovi) das sogenannte Kükendrahtmuster nach, welches sich auf dem äußeren Blatt der doppelten Innenmembran darstellt. Es besteht aus hexagonal angeordneten Proteinpartikeln mit einer Größe von 116 Å.

Die einzelnen Hexagone messen 0,35 µm in der Höhe, 0,3 µm in der Breite, ihre Seitenteile sind 0,19 µm hoch. Diese "Kükendrahtstruktur" beobachten AIKAWA (1967) und SEED und Mitarb. (1971), ebenfalls nach Anwendung der Gefrierätztechnik, auch bei Plasmodien. GÖBEL (1976) schreibt ihr die Funktion eines Scherengitters beim Eindringen des Parasiten in die Wirtszelle zu. Während GÖBEL (1976) auf der äußeren Membran der Babesie nur stellenweise in Reihen angeordnete Partikel beobachtet, sonst aber von gleichmäßiger Verteilung derselben spricht, können KREIER und Mitarb. (1975) an Babesia rodhaini und Babesia microti Gray strain sogar Merozoiten und Trophozoiten an dem unterschiedlichen Äußeren der Pellicula erkennen. Sie sprechen bei Merozoiten von rauher und bei Trophozoiten von weicher Oberfläche.

Das Vorhandensein von Invaginationen, die in früheren Arbeiten als Nahrungsvakuolen bezeichnet werden (RUDZINSKA und TRAGER, 1962; SIMPSON, KIRKHAM und KLING, 1967; DENNIG und HEBEL, 1969) gilt seit den Untersuchungen von RUDZINSKA (1976) an Babesia microti als gesichert. Es handelt sich um Einstülpungen der Parasitenpellikula, die von Erythrozytenstroma ausgefüllt sind. GÖBEL und DENNIG (1976) sowie LANGRETH (1976) bezeichnen sie ebenfalls als Invaginationen und schreiben ihnen eine für die Nahrungsaufnahme durch Pinocytose wichtige Oberflächenvergrößerung zu. Sie kommen weder bei Babesien in der Vermehrungsphase (HOYTE, 1964) noch bei freiliegenden Formen vor (LANGRETH und TRAGER, 1975).

Auffallend bei dem Umbau des Hämoglobins ist das Fehlen des bei Plasmodien gut sichtbaren Abbauprodukts Hämozoin (SEED und Mitarb., 1976). Nach Untersuchungen von PATZIG (1978) scheinen jedoch bei Babesia microti Hämoglobinabbauprodukte in den multimembranösen Strukturen aufzutreten.

Der Zellkern der Babesien ist sehr groß, in jungen Zellen ovoid, in älteren Trophozoiten unregelmäßig begrenzt(RUDZINSKA, 1976). Er liegt

meist randständig und wird von einer Doppelmembran, die von Kernporen durchbrochen ist, umgeben. Jedes Blatt der Kernmembran ist 80-100 Å dick, der Intermembranspalt beträgt bei Babesia canis und Babesia caballi 100-180 Å (SIMPSON, SILO und STOLIKER, 1969), bei Babesia rodhaini 120-320 Å (RUDZINSKA und TRAGER, 1962). Die Kernporen sind nach HEBEL und DENNIG (1969) bei Babesia berbailuri 700-1000 Å breit. Das Karyoplasma ist fein granulär oder filamentös (FLEWETT und FULTON, 1969), die Chromatingranula lagern sich häufig zu rundlichen Ansammlungen zusammen (HEBEL und DENNIG, 1969). Ein Nukleolus ist nicht eindeutig erkennbar (BÜTTNER, 1968).

Die Kerndoppelmembran ist mit dem endoplasmatischen Retikulum des Parasiten verbunden, welches rauh oder glatt sein kann. Es bildet sowohl Schläuche als auch Vesikel; dabei befinden sich auf den Vesikelmembranen keine Ribosomen. Dieses glatte endoplasmatische Retikulum befindet sich besonders in der Nähe des Zellkerns (PATZIG, 1978). Freie Ribosomen sind über das ganze Zytoplasma verteilt (RUDZINSKA und TRAGER, 1977).

Typische Mitochondrien konnten bisher noch nicht nachgewiesen werden. RUDZINSKA und TRAGER (1962 und 1974a) fanden konzentrische Doppelmembranen, welche sie als Mitochondrien ansprechen. Auch DENNIG und HEBEL (1969) und LANGRETH (1976) fanden solche multimembranösen Organellen. Die speziellen bei Babesien vorkommenden Mitochondrien zeigen grundsätzlich einen Aufbau von tubulusähnlichem Charakter (FRIEDHOFF und SCHOLTYSECK, 1968).

Ein Golgi-Apparat wird von RUDZINSKA und TRAGER (1962), SHORTT und BLACKIE (1965) und MOLYNEUX und BAFORT (1970) bei Nagerbabesien beschrieben. Er besteht aus einer Gruppe von kleinen Bläschen mit glatter Oberfläche, die sich oft in Kernnähe befinden. Der zwischen Rhoptrien und Zellkern gelegene sphärische Körper kommt in Ein- oder Mehrzahl vor (FRIEDHOFF, 1974). Er ist bei Sporozoiten (Merozoiten) in den Speicheldrüsen adulter Zecken von einer einfachen Membran umgeben (FRIEDHOFF, SCHOLTYSECK und WEBER, 1972); diese fehlt bei den Blutformen (GÖBEL und DENNIG, 1976). Er hat einen maximalen Durchmesser

von 1,06 µm und besteht aus grob bis blasig strukturiertem Material (SCHOLTYSECK, MEHLHORN und FRIEDHOFF, 1970). Da er nach histochemischen Untersuchungen viele Proteine enthält, ist er möglicherweise ein Ort der Proteinsynthese (WEBER und FRIEDHOFF, 1969); nach AIKAWA (1966) spielt er eine Rolle als Energiespeicher.

Die motilen und infektiösen Stadien der Babesien im Blut (=Merozoiten) zeigen im Gegensatz zu den Mutterzellen (=Trophozoiten) einen deutlich ausgeprägten Apikalkomplex, bestehend aus Polring, Rhoptrien und Mikronemen (FRIEDHOFF und SCHOLTYSECK, 1970; GÖBEL und DENNIG, 1976). Die Polringe sind nach GÖBEL und DENNIG (1974) doppelt konturierte Verdickungen der inneren Membran. Sie befinden sich an einem oder beiden Polen der Zelle und verstärken den Rand der Membranöffnungen (SCHOLTYSECK und MEHLHORN, 1973). Rhoptrien befinden sich im oberen Drittel der Merozoiten (POTGIETER und ELS, 1977a) oder sind im Zytoplasma verstreut (GÖBEL, PATZIG und KRAMPITZ, 1978). Sie stellen 2 oder mehr keulenförmige Gebilde dar, deren dünne Ausführungsgänge am apikalen Pol münden. Ihr hinterer, tropfenförmiger Bereich ist osmiophil granuliert bis diffus gezeichnet. Sie bilden proteolytische Fermente, die bei der Penetration des Parasiten in die Wirtszelle zur Auflösung der Zellmembran dienen (SCHOLTYSECK und MEHLHORN, 1973). Diese Annahme wird gefestigt durch den Nachweis von saurer Phosphatase in den Rhoptrien von Gregarinen (SCHREVEL, 1968). Die Rhoptrien von Babesia microti sind 300 nm groß (RUDZINSKA, 1976). Die Mikronemen sind bis zu 10 kleine osmiophile Strukturen im vorderen Drittel der Merozoiten (GÖBEL und DENNIG, 1976), die einen Durchmesser von 600-900 Å haben. Sie sind gewunden oder langgestreckt, im Querschnitt sphärisch. Ihre Funktion ist unbekannt, ein Zusammenhang mit den Rhoptrien (SCHOLTYSECK und MEHLHORN, 1973) oder mit dem Golgi-Apparat (RUDZINSKA, 1976) wird diskutiert.

Das Eindringen von Babesia microti in den Wirts-Erythrozyten untersuchten RUDZINSKA und Mitarb. (1976). Sie beschreiben, daß sich um den Parasiten eine Invagination als parasitophore Vakuole bildet. Diese invaginierte Erythrozytenmembran verschwindet jedoch sofort nach Penetration.

III. Eigene Untersuchungen

A. Material und Methoden

Als Versuchstiere für die Anzüchtung von Babesia canis dienten 8 Beagles beiderlei Geschlechts im Alter von 9 Wochen bis zu 16 Monaten. Der mit Babesia gibsoni infizierte Beagle-Rüde war bei Versuchsbeginn 8 Monate alt. Die Hunde stammten aus institutseigener Zucht und befanden sich bei Versuchsbeginn in einem guten Gesundheitszustand. Ihre Ernährung bestand aus Altromin-H, Milch und Wasser.

Die Parasitenstämme werden im Institut auf latent infizierten Hunden gehalten. Durch schnell aufeinanderfolgende Übertragungen von parasitenhaltigem Blut von Hund zu Hund wurde die Virulenz der Erreger gesteigert. Dabei wurden 1-10 ml Blut i.v. oder i.p. injiziert. Die Höhe der Parasitämie überprüfte ich täglich anhand von Blutausstrichen, wobei das Blut nach Scheren und Desinfizieren der Schwanzspitze mit Hilfe einer Blutlanzette gewonnen wurde. Zum Vergleich fertigte ich Ausstriche von venösem Blut aus der Vena cephalica antebrachii an. Nach Lufttrocknung wurden die Ausstriche mit Methanol fixiert, nach 5 Minuten abgegossen, luftgetrocknet und dann mit Giemsa-Lösung über 40 Minuten gefärbt. Die Anzahl der parasitierten Erythrozyten wurde durch mäanderförmige Durchmusterung der Präparate bei 1000facher Vergrößerung bestimmt, wobei die Anzahl der Babesien pro Erythrozyt unberücksichtigt blieb.

Zur elektronenoptischen Präparation verwendeten wir Blut mit einer Parasitämie von 45% bei Babesia gibsoni bzw. 15% bei Babesia canis.

Für die Gefrierätzung von Babesia gibsoni wurden 10 Tropfen Blut direkt aus der Vene ohne Koagulans über eine Kanüle in ein Reagenzglas mit 9 ml Fixativ bzw. Gefrierschutzmedium getropft. Mit Babesia canis infiziertes Blut wurde ohne Zusatz aus dem lateralen Ohrrand gewonnen.

Als Fixativ diente eine eisgekühlte 1%ige Glutaraldehydlösung in 0,1 M Natrium-Cacodylatpuffer bei pH 7,2. Nach 30 Minuten Fixierzeit bei 4°C wurde die Probe 5 Minuten lang bei 2000 Upm zentrifugiert, der Überstand abgegossen, das Sediment dreimal mit Cacodylatpuffer gewaschen, dann in 30%iger gepufferter Glycerinlösung als Gefrierschutzmittel resuspendiert und für 30 Minuten bei 22°C inkubiert. Unfixierte Proben inkubierten wir für jeweils 30 Minuten in 10%igem, 20%igem und 30%igem Glycerin. Die weitere Behandlung verlief für fixierte und unfixierte Proben gleich.

Nach Zentrifugieren und Abgießen des Glycerins übertrugen wir ein Blutröpfchen mit Hilfe einer vorne abgeschmolzenen und ausgezogenen Pasteurpipette mit kleiner Öffnung auf ein Präparatträgerplättchen aus Gold-Nickel-Legierung. Das Einfrieren der Proben geschah zunächst für etwa 5 Minuten in flüssigem Freon 22 ($CH\,Cl\,F_2$, Erstarrungspunkt -160°C), welches in einem Dewar-Gefäß mit flüssigem Stickstoff verflüssigt wird. Sodann wurde die Probe in flüssigen Stickstoff überführt und darin auf -196°C gebracht. Alle eingefrorenen Objekte wurden bis zur Weiterverarbeitung unter Stickstoff aufbewahrt.

Die Gefrierätzung erfolgte in einer Gefrierätzanlage (BALZER BAF 300). Das Präparat wurde schnell auf den auf -150°C vorgekühlten Objekttisch aufgebracht und unter einem Vakuum von ca. 10^{-6} Torr bei -100°C mit dem auf -190°C gekühlten Messer geschnitten (=gebrochen). Die in der angeschnittenen Oberfläche sich befindlichen Objektstrukturen wurden mittels Sublimation des sie umgebenden Eises aus der Umgebung hervorgehoben. Dieser Vorgang, der auch als "Ätzen" bezeichnet wird, erfolgte mittels dem über dem Objekt stehenden Messer, wobei das Temperaturgefälle von 90°C ausgenutzt wurde. Die Ätzzeit betrug 60-90 Sekunden.

Zur Darstellung der freigelegten Objekte wurde die Schnittfläche nun aus einem Winkel von 45° mit Platin (Kontrastgeber) und Kohle für 5 Sekunden bedampft. Danach erfolgte eine weitere Bedampfung für 8 Sekunden mit reiner Kohle aus einem Winkel von 90° zur Stabilisierung des Abdruckes. Nach Beheizen der Anlage wurde der Objekt-

halter mit Probe in destilliertes Wasser überführt, um diese abzulösen. Das Reinigen des Abdruckes von noch anhaftendem biologischen Material - hier Blut - erfolgte in 70%iger Schwefelsäure und Eau de Javelle. Beide Reinigungsbäder wurden nach Zwischenspülungen mit Aqua dest. wiederholt, bis der Abdruck sauber war. Dieser wurde dann auf Formvar befilmte Objektträgernetze für das Elektronenmikroskop aufgezogen.

Die Präparation des Blutes für Einbettung und spätere Anfertigung von Ultradünnschnitten wurde nach herkömmlicher Methode durchgeführt. Zehn Tropfen peripheres Blut wurden direkt in ein Reagenzglas mit gekühltem 2,5%igem Glutaraldehyd in 0,1 M Natrium-Cacodylatpuffer (pH 7,2) getropft und über 2 Stunden bei 4°C fixiert. Nach einem anschließenden Zentrifugieren von 5 Minuten bei 2000 Upm wurde das Fixativ dekantiert und das Sediment viermal mit Cacodylatpuffer gewaschen. Zur Nachfixierung diente 1%iges gepuffertes Osmiumtetroxid (pH 7,2) für 60 Minuten bei 4°C. Die Entwässerung der Proben erfolgte in aufsteigender Alkoholreihe und Propylenoxid, wobei im 70%igen Alkohol eine Blockzwischenkontrastierung mit 1%igem Uranylacetat für 12 Stunden durchgeführt wurde. Als Intermedium diente Propylenoxid im Verhältnis 1:2 zum Einbettungsmittel. Zwischen den einzelnen Stufen fand Resuspension und anschließendes Zentrifugieren der Proben über 5 Minuten bei 2000 Upm statt.

Die Einbettung erfolgte in Epon 812 (Shell Chemie), dessen Polymerisation 24 Stunden bei 60°C dauerte. Die Ultradünnschnitte wurden auf einem Porter-Blume-Mikrotom Mt 1 und auf einem LKB Ultrotom III angefertigt, die dafür notwendigen Glasmesser mit einem LKB Knife-Maker gebrochen. Die Nachkontrastierung der Schnitte erfolgte mit Uranylacetat und Bleicitrat.

Die Auswertung der mit Hilfe der Gefrierätztechnik erstellten Abdrücke wie auch der Ultradünnschnitte führten wir mit einem Elmiskop 101 (Siemens) durch, die fotographischen Abbildungen wurden auf Agfa-Scientia Platten 23D56 aufgenommen.

B. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit werden klinische Erfahrungen nach experimenteller Infektion von Hunden aufgezeichnet sowie insbesondere elektronenmikroskopische Befunde der auf diese Art angezüchteten Babesien beschrieben.

1. Klinische Beobachtungen und Parasitämieverlauf

Durch Babesia canis wurde als erstes sichtbares klinisches Zeichen bei 4 Hunden eine seröse bis eitrige Konjunktivitis hervorgerufen, in einem Fall bereits einen Tag vor dem erstmaligen Nachweis der Babesien im Blut. Später trat vermehrte Atemfrequenz auf mit abdominalem Atemtyp. Bei der Sektion wurde ein Lungenödem diagnostiziert. Es kam zu Husten, in einem Fall zu Speicheln und Schaumaustritt aus den Nasenöffnungen. Es zeigte sich ein gesteigertes Bedürfnis zur Wasseraufnahme. Die Anämie äußerte sich durch blasse Schleimhäute und ein anämisches Herzgeräusch bei der Auskultation. Die Erythrozytenzahlen sanken bis auf 1,1 Mill. pro mm^3. Die Körpertemperatur stieg an bis auf Werte um $40^{\circ}C$, im Extremfall sogar bis $42^{\circ}C$. Dabei konnte eine Parallelität zwischen Anstieg der Parasitämie und Temperaturverlauf festgestellt werden. Die Schwere der klinischen Erscheinungen dagegen war völlig unabhängig von der Höhe der Körpertemperatur.

Bei zwei Hunden trat eine rezidivierende Hämoglobinurie auf, vergesellschaftet mit Harnträufeln. Bei einem Beagle kam es für die Dauer von 3 Tagen zu Hinterhandschwäche, wobei das Tier an einem Tag völlig fest lag. Dabei war der Zwischenzehenreflex vermindert. In einem Fall zeigte sich geringfügig Blut im Kot. Bei allen Tieren trat bei der Sektion eine stark vergrößerte Milz hervor. Bei einem Hund wiesen wir die Ansammlung einer bernsteingelben Flüssigkeit in der Bauchhöhle nach.

Babesia gibsoni verursachte außer Inappetenz und Anämie keine besonderen klinischen Erscheinungen.

Die Anzüchtung von Babesia canis in einer für die Elektronenmikroskopie genügend hohen Parasitämie bereitete Schwierigkeiten. In der ersten Versuchsreihe mit 6 Hunden kam es 3 Tage p.i. zu einer maximalen Parasitämie von 8% im venösen Blut. Diese erwies sich für elektronenmikroskopische Auswertungen als zu gering. Es stellte sich heraus, daß die Befallstärke zwischen venösem Blut und den ersten Tropfen Kapillarblut starken Schwankungen unterworfen ist. Der Unterschied betrug bis zu 18%. Dem Hund Nr. 5 der Versuchsreihe wurden am 7. Tag p.i. 0,7 mg/kg KGW Betamethason i.m. appliziert, woraufhin die Parasitämie im Kapillarblut von 2,4% auf 22% anstieg. Im venösen Blutausstrich allerdings konnten nur 4% mit Parasiten befallene Erythrozyten gezählt werden. Hund Nr. 6 wurde am 5. Tag nach der Infektion entmilzt, woraufhin kein weiterer Anstieg der Parasitenzahl erfolgte. Die Hunde Nr. 1-4 waren alle schwach positiv.

Mit der Splenektomie des inzwischen im Blutausstrich wieder negativen Hundes Nr. 3 etwa 20 Wochen nach der Erstinfektion begann die zweite Versuchsreihe. Schon am ersten Tag nach der Entmilzung zeigten sich Babesien im Blut. 3 Tage später erfolgte eine Blutübertragung auf den 9 Wochen alten Welpen Nr. 7. Dieser erreichte einen Parasiten-Höchstwert von 2,4%. Hund Nr. 3 starb 11 Tage nach Splenektomie infolge einer schweren Anämie. Dem toten Hund wurde Herzblut entnommen und auf einen weiteren 9 Wochen alten Welpen übertragen. Dieser zeigte nach 9 Tagen eine Parasitämie von 15%, welche sich für die elektronenmikroskopische Untersuchung als günstig erwies.

Der Träger von Babesia gibsoni war ein latent infizierter Hund, der 17 Tage nach Splenektomie die ersten Parasiten im Blut aufwies. Die Parasitämie stieg kontinuierlich an, bis sie 9 Tage nach Auftreten der ersten Babesien den Höchstwert von 45% erreichte. Dies reichte für die ultrastrukturellen Untersuchungen voll aus.

2. Elektronenmikroskopische Befunde

Babesia canis stellt sich als große Babesie dar, die etwa 1/3 - 1/4 des Erythrozyten ausfüllt und 1,5-4 µm mißt. Die intraerythrozytären Formen haben lichtmikroskopisch einen hellen Innenhof, der von einem bläulichen Zytoplasmasaum begrenzt ist. An der Peripherie des Parasiten wird ein umschriebener stark lichtbrechender Bezirk deutlich. Den extraerythrozytären Formen fehlt der helle Innenbezirk. Sie sind gleichmäßig blau-violett angefärbt und können als birnenförmige Merozoiten angesprochen werden (Abb. 1c). Die intraerythrozytären Parasiten dagegen zeigen eine vielfältige Formenvarianz. Die Birnenformen liegen meist paarweise im roten Blutkörperchen. Auftretende Malteserkreuzformen oder selten vorkommende Rundformen mit knospenartigen Auftreibungen (Abb. 1a) stellen Teilungsformen dar, wobei die Mutterzellen in der Regel rund bis ovoid (Abb. 1d), die Tochterzellen klein und mehr länglich gestreckt sind (Abb. 1b und 1d).

Bei geringem Befall sind nur vereinzelt Babesien in den Erythrozyten zu finden. Mit zunehmender Befallsstärke steigt das Auftreten von Teilungsformen an, die Anzahl der freiliegenden Babesien nimmt zu, ebenso die Anzahl der Parasiten pro Erythrozyt (bis zu 8 Babesien). Bei starkem Befall werden gehäuft Phagozytosen beobachtet. Dauert die Erkrankung länger an, werden zunehmend jugendliche Erythrozyten im Blutausstrich beobachtet, die auch von Babesien befallen werden.

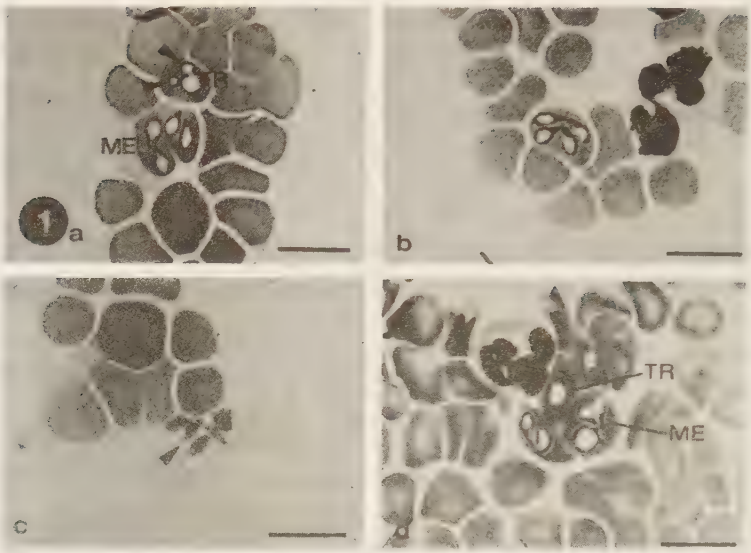

Abb. 1: Babesia canis im Blutausstrich (Giemsa-Färbung)
Meßbalken entspricht 10 µm

a) Birnenförmige Merozoiten (ME), paarweise gelegen, Trophozoit (TR) mit Merozoitenbildung (Pfeile)

b) Vierfachteilung

c) Freie Merozoiten (Pfeil)

d) Trophozoiten (TR) und Merozoiten (ME)

Babesia gibsoni unterscheidet sich deutlich von der anderen Hundebabesie. Sie ist etwa um die Hälfte kleiner, ihre Größe beträgt 0,7-1,5 µm. Trophozoiten und Merozoiten sind beide rund bis oval, seltener auch länglich. Es fanden sich bis höchstens 6 Parasiten in einem Erythrozyten (Abb. 2a).

Die im Lichtmikroskop wegen der Kleinheit der Parasiten nur andeutungsweise aufgezeigten morphologischen Differenzen können elektronenmikroskopisch manifestiert werden. Die Anwendung einer physikalischen (Ge-

frierätzung) und einer chemischen Präparationsmethode (Ultradünnschnitte) läßt ergänzende Ergebnisse und Aussagen erwarten.

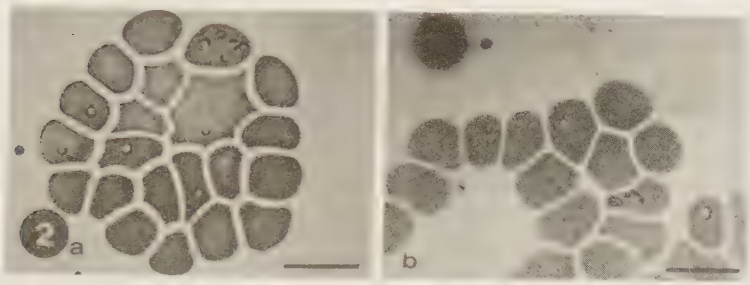

Abb. 2: Babesia gibsoni im Blutausstrich (Giemsa-Färbung)
Meßbalken entspricht 10 µm
a) Fünffacher Befall eines Erythrozyten
b) Runde und längliche Formen

Abkürzungen:

CY : Parasiten - Zytoplasma
DRH: Ausführungsgänge der Rhoptrien
E : Erythrozyt
Ee : E-Fläche der äußeren Membran
Em : E-Fläche der mittleren Membran
Ei : E-Fläche der inneren Membran
EM : Erythrozytenmembran
ER : Endoplasmatisches Retikulum
IM : Innerer Membrankomplex
IV : Invagination
KN : Merozoitenknospe
ME : Merozoit
MI : Mitochondrium
MN : Mikronemen
N : Kern
NM : Kernmembran
OM : Äußere Membran
P : Polring
PE : Pellikula
Pe : P-Fläche der äußeren Membran
Pm : P-Fläche der mittleren Membran
Pi : P-Fläche der inneren Membran
RH : Rhoptrien
VE : Vesikel
WO : Multimembranöse Struktur

Die Meßbalken entsprechen, wenn nicht anders vermerkt, auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen 0,5 µm.

Auf den Gefrierätzabbildungen geben die Pfeile im rechten oberen Bildrand die Beschattungsrichtung an.

Die Lage von Babesia canis kann als intraerythrozytär zentral gelegen bezeichnet werden. Allerdings trifft das nur für Einzelbefall zu. Bei Mehrfachbefall eines roten Blutkörperchens ist keine typische Lagerung mehr möglich. Teilungsformen bilden untereinander häufig einen Winkel von 90°. Diese Merozoiten sind birnenförmig, wobei der apikale Pol stumpf und der hintere Pol spitz ist (Abb. 3 und 4). Trophozoiten dieser Spezies sind stets rund bis ovoid in ihrer Grundform, ihre Grenzen sind allerdings nicht glatt, sondern mit z.T. großen Einstülpungen versehen (Abb. 5 und 6).

Babesia gibsoni zeigt als wesentlich kleinerer Parasit ganz andere morphologische und topographische Verhältnisse. Tochterzellen und Mutterzellen sind rund und unterscheiden sich nur in ihrer Größe (Abb. 7). Die Lage kann randständig bis zentral jede mögliche Position im Erythrozyten einnehmen, wobei die Merozoiten als Knospen an der Mutterzelle oder als Satelliten um diese herum angeordnet sind (Abb. 7). Eine charakteristische Winkelstellung der Vermehrungsformen zueinander kann nicht beobachtet werden.

Zur Differenzierung von Merozoiten und Trophozoiten der Babesien ist neben den Organellen des Apikalkomplexes besonders der Aufbau ihrer Pellikula von grundlegender Bedeutung. Im Verlaufe der vorliegenden Untersuchungen konnten die bisher aus der Ultradünnschnittechnik resultierenden Ergebnisse mit Hilfe der Gefrierätzung nicht nur bestätigt, sondern auch ergänzt werden. Zur Beschreibung der Ergebnisse verwende ich die Nomenklatur, die DUBREMETZ und TORPIER (1978) in Anlehnung an BRANTON und Mitarb. (1975) festlegten. Die Verfasser gehen

Abb. 3: Babesia canis, Teilungsvorgang (Gefrierätzung). Typische birnenförmige Merozoiten (ME), im rechten Winkel zueinander stehend.

Abb. 4: Babesia canis-Merozoit im Ultradünnschnitt, Birnenform.

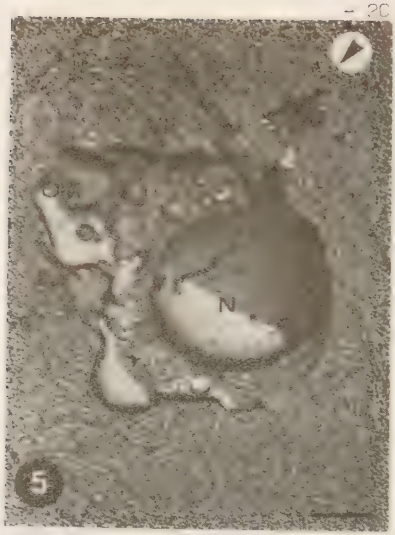

Abb. 5: Babesia canis, Trophozoit nach Gefrierätzung. Späroide Form mit gewellter äußerer Begrenzung (OM).

Abb. 6: Babesia canis-Trophozoit im Ultradünnschnitt. Äußere Membran (OM) tief eingebuchtet (Pfeil).

Abb. 7: Babesia gibsoni, Trophozoit mit satellitenartig angeordneten Merozoiten (ME).

bei der Darstellung ihres Modells davon aus, daß nach Gefrierätzung keine äußeren Membranoberflächen dargestellt werden können. Vielmehr werden die Membranen aufgrund ihrer polaren Struktur, d.h. ihrem Aufbau aus einer Schicht von Lipoiden und zwei äußeren Proteinschichten mit positiver und negativer Ladung, gespalten.

Die Folge davon ist, daß dem Betrachter entweder die dem Parasitenzytoplasma zugewandte Hälfte der Elementarmembran sichtbar wird (P-Fläche) oder die korrespondierende Hälfte (E-Fläche). So stellt sich bei konvexer Abbildung der Babesie die äußere Membran (e-Membran) mit ihrer P-Fläche dar (=Pe), ebenso die innere Membran der Pellikula (=Pi).

Die P-Fläche der mittleren Membran (=Pm) zeigt jedoch auf den schmalen Zytoplasmasaum zwischen äußerer Membran und innerem Membrankomplex und liegt deshalb der P-Fläche der äußeren Membran direkt gegenüber. Daher stellt sich bei konvexer Abbildung die E-Fläche der mittleren Membran dar (=Em). Werden die Membranen vom Betrachter als konkav gesehen, zeigen sie die Ee-, Pm- und Ei-Fläche (Modell Abb 8).

Demnach ergibt sich für die Merozoiten von Babesia canis folgender Membranaufbau: das in Ultradünnschnitten als einfache Membran erscheinende äußere Membranblatt der Pellikula läßt auf Abbildungen nach Gefrierätzung auf der Pe-Fläche, d.h. der konvex gewölbten Fläche, die zum Zytoplasma des Parasiten hin gelegen ist, zahlreiche unregelmäßig angeordnete 17-20 nm große Proteinpartikel erkennen (Abb. 9, Pe). Die Gefrierätzung gewährt ferner dem Betrachter Einblick auf die konkave Seite dieser Membran (Abb. 10, Ee). Sie bedeutet die dem Erythrozytenstroma zugewandte Fläche und ist dicht mit 12-16 nm großen Partikeln besetzt.

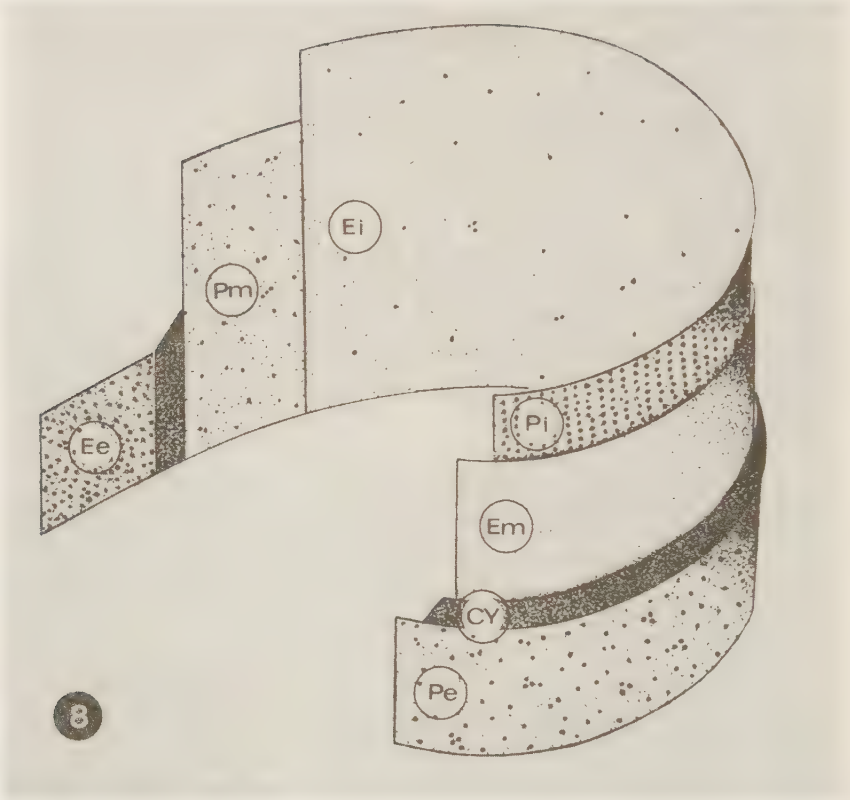

Abb. 8: Membranmodell einer Merozoitenpellikula nach Gefrierätzung. Konvex gesehen das äußere (Pe), das mittlere (Em), mit dazwischen liegender Zytoplasmaschicht (CY), und das innere (Pi) Membranblatt. Konkav gesehen die jeweils gegenüberliegenden Seiten von innen nach außen (Ei, Pm, Ee).

Im Ultradünnschnitt wird als innerer Membrankomplex eine mehrfach unterbrochene Doppelmembran, bestehend aus zwei Elementarmembranen, deutlich (Abb. 4, IM). Konvex gesehen stellt die eine der beiden auf

Abbildungen nach Gefrierätzung die Em-Schicht dar, konkav gesehen ist die anliegende die Pm-Schicht. Beide Schichten zeigen einen etwa gleichen Proteinpartikelbesaß von 7-8 nm Größe und geringer Dichte (Abb. 9, Em; Abb. 10, Pm).

Die andere der beiden inneren Elementarmembranen, d.h. die dem Parasitenzytoplasma am nächsten gelegene, zeigt ebenfalls nur nach Gefrierätzung diesen charakteristischen Aufbau. Nach Spaltung der beiden Membranblätter wird das vom Betrachter als konvex empfundene Blatt als Pi-Schicht bezeichnet. Sie ist mit Proteinpartikeln von 15-17 nm Größe besetzt, die in parallelen Reihen angeordnet sind (Abb. 9, Pi). Die konkav sich darstellende Seite des Mambranblattes wird als Ei-Schicht bezeichnet. Die sie besetzenden Partikel haben eine Größe von 12-16 nm, sind unregelmäßig verteilt und zeigen untereinander einen großen Abstand von etwa 100 nm (Abb. 10, Ei).

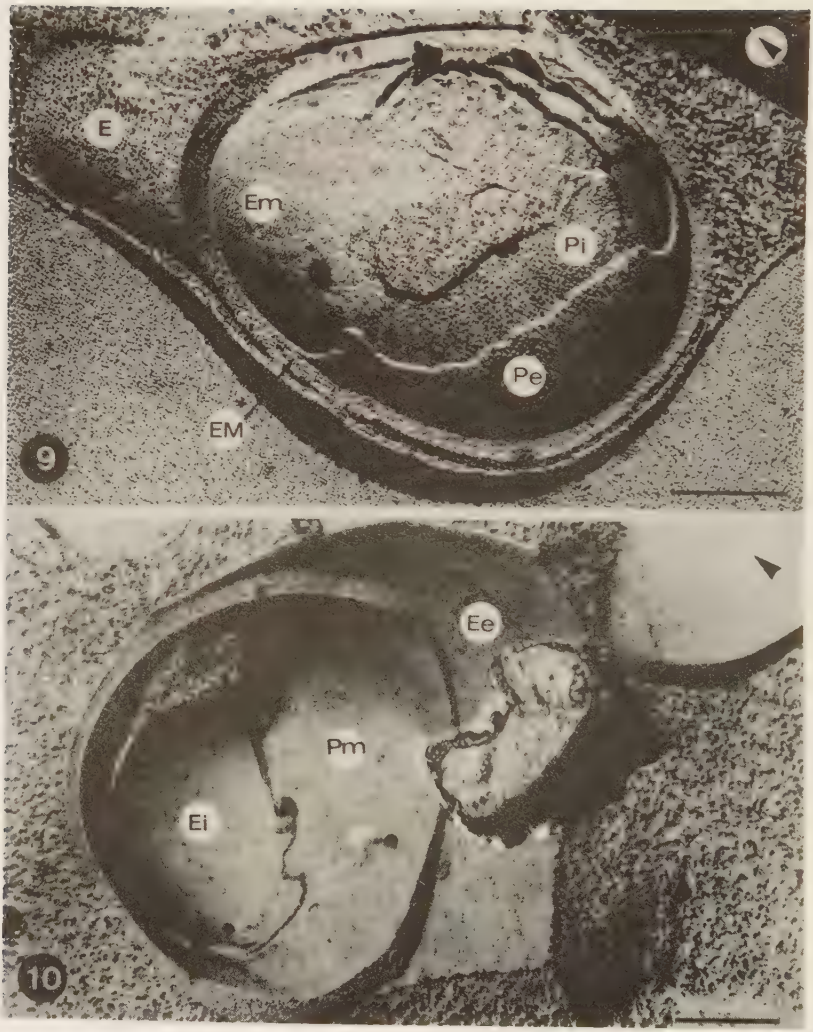

Abb. 9: Babesia canis-Merozoit nach Gefrierätzung. 3-schichtiger Aufbau der Pellikula, konvex dargestellt das äußere (Pe), mittlere (Em) und innere (Pi) Membranblatt.

Abb.10: Babesia canis, Aufbau der Pellikula eines Merozoiten. Konkav dargestellt die den in Abb. 9 gezeigten Membranen gegenüberliegenden Flächen (von innen nach außen Ei, Pm, Ee).

Bei den Babesia gibsoni-Parasiten, die von uns ermittelt werden konnten, handelt es sich um Trophozoiten oder um sog. Intermediärformen. Membranspalten in verschiedenen Ebenen konnten nicht dargestellt werden. Die auf Ultradünnschnitten der Mutterzellen vorgefundenen Membranen zeigen den typischen Aufbau einer Elementarmembran (Abb. 11b). Dieses als Doppelblatt ausgebildete Plasmalemma konnte mit der Gefrierätzung nur in der konvexen Pe-Schicht dargestellt werden (Abb. 11a). Sie zeigt in diffuser Verteilung kleine (etwa 8 nm) und große (16 nm) Partikel auf ihrer Oberfläche.

Abb. 11: Babesia gibsoni

a) Äußere Membran nach Gefrierätzung mit der dem Parasitenzytoplasma zugewandten Fläche (Pe)

b) Ultradünnschnitt; äußere Membran eines Trophozoiten als einfache Elementarmembran (Pfeil)

Neben diesem typischen Aufbau der Membranen von Trophozoiten und Merozoiten kann eine Differenzierung dieser Zellen auch in beschränkten Maßen anhand der Strukturen des Apikalkomplexes vorgenommen werden, allerdings mit der Einschränkung, daß bei sog. Übergangsformen (=Intermediärformen), die eine Transformation von Merozoiten in Trophozoiten bedeuten, dieses nicht mehr möglich ist.

Throphozoiten von Babesia canis zeigen neben einem großen peripher gelegenen Kern (Abb 6, N) glattes und rauhes endoplasmatisches Retikulum (Abb. 12 und 13, ER), mit einer Doppelmembran umgebene Mitochondrien (MI) und gelegentlich auch multimembranöse Strukturen (WO) (Abb. 6, WO). Diese Organellen werden auch bei Babesia gibsoni gefunden (Abb. 14 und 15, ER, MI, WO), wobei den kleineren Ausmaßen des Parasiten Rechnung getragen wird. Zudem weist Babesia gibsoni fast immer eine große Invagination der Pellikula auf, die von einer kleinen begleitet werden kann (Abb. 15, IV). Der Zellkern kann dadurch von seiner runden in eine längliche Form gezwungen werden (Abb. 15, N). Babesia canis zeigt nur manchmal solche mit Erythrozytenstroma ausgefüllten Einziehungen der Parasitenmembran.

Die Vermehrung der Babesien erfolgt durch Kernknospung als erstem Schritt. Wie Abb. 16 von Babesia canis nach Gefrierätzung zeigt, folgt darauf die Abschnürung eines Kernsegments. Die Parasitenpellikula wird dabei noch nicht verändert. In einem weiteren Stadium entstehen bis zu 4 neue Parasiten aus einer Mutterzelle. Die äußere Form der Merozoiten ist dann meist birnenförmig. Bei der viel kleineren Babesia gibsoni ist der Vorgang als solcher wohl derselbe. Jedoch erfolgt das Auswachsen der Tochterzellen aus den Trophozoiten in Form von kleinen runden Knospen (Abb.17, KN), die sich alsbald an einer dafür vorgesehenen Prädilektionsstelle (Abb. 17, Pfeil) ablösen. Sie behalten ihre runde Form; ihre Zahl scheint viel größer als bei Babesia canis zu sein (Abb. 7).

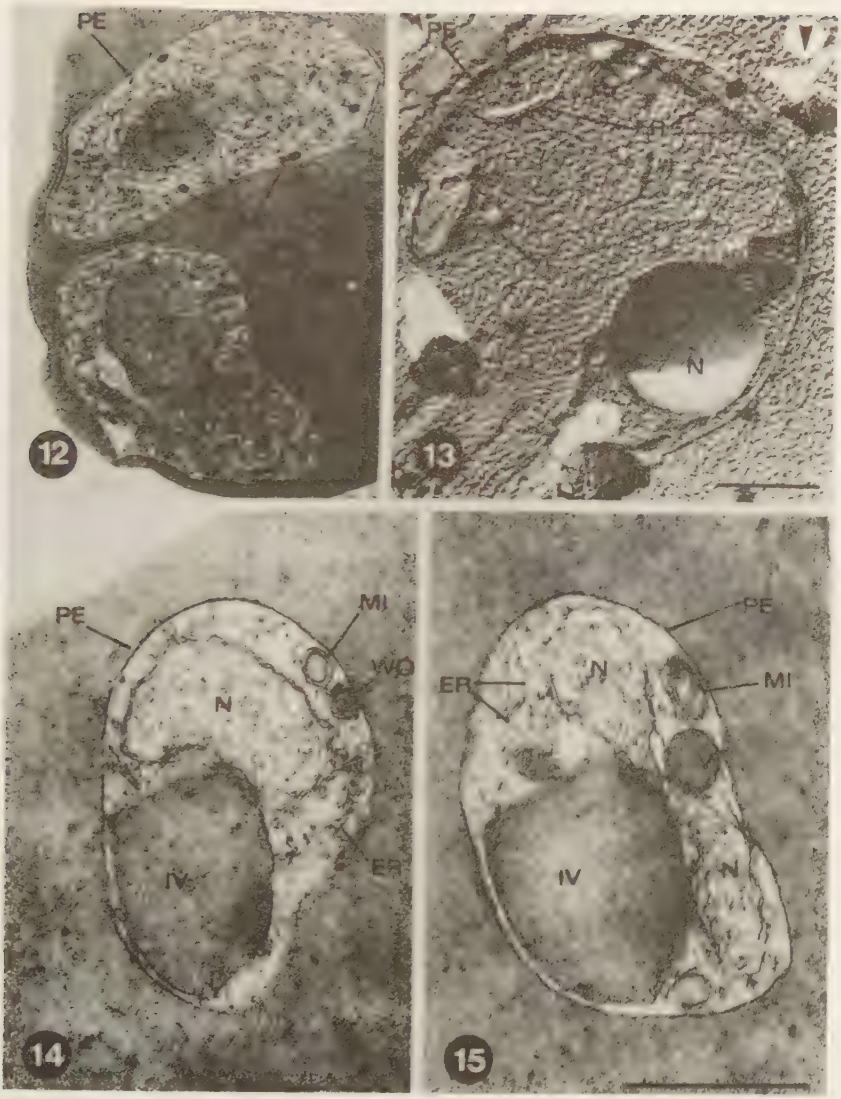

Abb. 12: Babesia canis-Merozoit. Darstellung des Bauplans im Ultradünnschnitt.

Abb. 13: Babesia canis-Trophozoit nach Gefrierätzung. Die Zellorganellen werden durch einen Querbruch freigelegt

Abb. 14 und 15: Babesia gibsoni-Trophozoiten. Ultradünnschnitt.

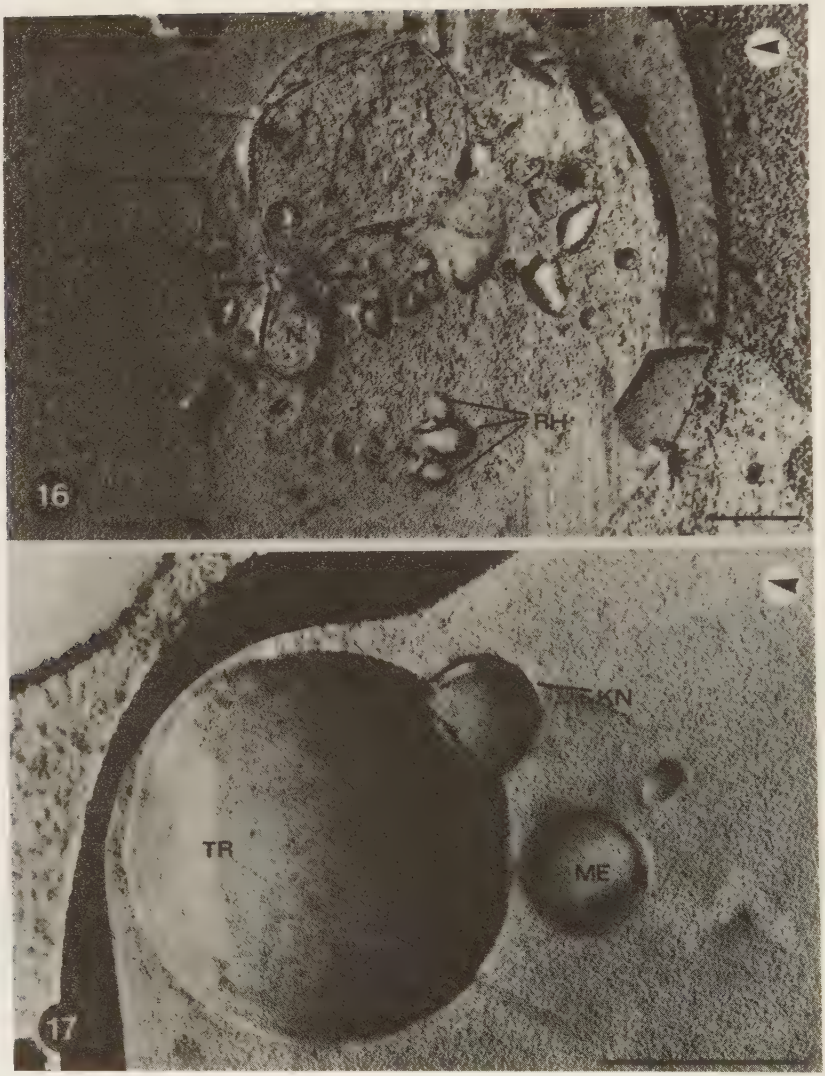

Abb. 16: Babesia canis. Vermehrungsform nach Gefrierätzung. Am Zellkern wird die Abschnürungsstelle deutlich (RH)

Abb. 17: Babesia gibsoni-Trophozoit mit Merozoitenknospe (KN) und dazugehörigem Absprengring

Bevor sich bei beiden Babesienspezies die Tochterzellen endgültig abtrennten, differenzieren sich in ihnen die für Merozoiten typischen Organellen des Apikalkomplexes. Besonders Babesia canis-Merozoiten zeigen dieses wie alle großen Babesien in deutlicher Form. Hervorragend sind sowohl im Ultradünnschnitt als auch an der Gefrierätzung die Rhoptrien mit ihren zahlreichen Ausführungsgängen erkennbar (Abb. 18a und b). Die Ausführungsgänge sitzen immer am spitzen Pol der Rhoptrien und zeigen zum apikalen Pol des Parasiten, der vom vorderen Polring (Abb. 19a) begrenzt wird. Umgeben sind die Rhoptrien von zahlreichen Mikronemen, die sich im Ultradünnschnitt als kleine, runde bis längliche, osmiophile Bezirke hervorheben (Abb. 19, MN). Nach Gefrierätzung befinden sie sich ebenfalls zwischen den Rhoptrien (Abb. 20, MN). Die Verhältnisse der Merozoiten von Babesia gibsoni stellen sich in analoger Weise dar. Allerdings konnten wir nur die Intermediärformen nachweisen, die bereits die Doppelmembranen verloren haben, jedoch die Organellen des Apikalkomplexes noch besitzen (Abb. 19 und 20).

Neben den beschriebenen Organellen zeigen sowohl Merozoiten als auch Intermediärformen den für jede Zelle gültigen Bauplan mit Kern, umgeben von doppelter Kernmembran und durchsetzt von Kernporen, und endoplasmatischem Retikulum; dieses ist in der Gefrierätzung nur als glattes erkennbar, kann jedoch in Ultradünnschnitten als rauh und glatt dargestellt werden. Daneben werden Mitochondrien vom tubulusähnlichen Typ sowie Ribosomen vorgefunden.

Mit Hilfe der Gefrierätzung konnten auch die topographischen Vorgänge bei der Auswanderung der Parasiten aus dem Erythrozyten dargestellt werden (Abb. 21-23). Demnach wird von der Babesie die Wirtsmembran nach außen vorgestülpt, wobei immer naherKontakt mit der Babesie besteht. Das Aufreißen an dieser Stelle dürfte die Folge davon sein; der Parasit wird frei.

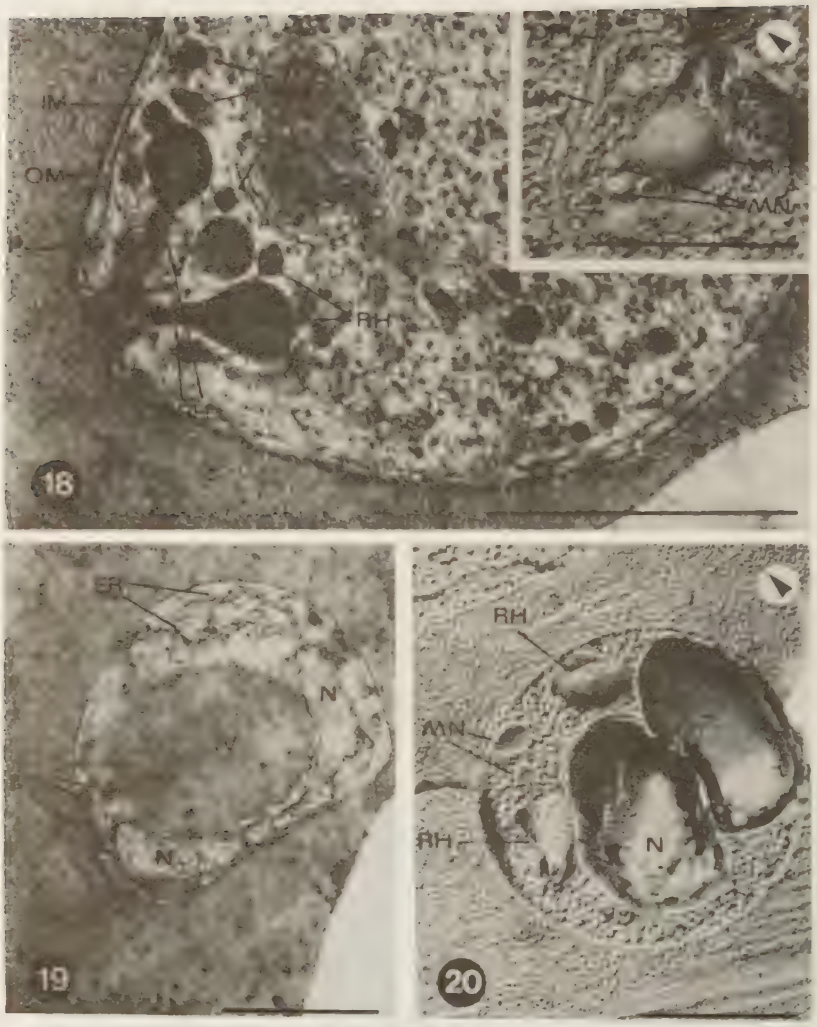

Abb. 18: Babesia canis-Merozoiten; Darstellung des Apikalkomplexes.
a) Ultradünnschnitt
b) Gefrierätzung

Abb. 19 und 20: Babesia gibsoni; sich zum Trophozoiten transformierende Merozoiten (=Intermediärformen)
19) Ultradünnschnitt
20) Gefrierätzung

Abb. 21-23: Babesia gibsoni; Auswanderungsvorgang der Parasiten aus dem Wirts-Erythrozyten

21) Erste Stufe mit peripherer Lage der Babesie und geringer Vorwölbung der Erythrozytenmembran (Pfeil)
22) Weitere starke Ausbuchtung der Wirtszellmembran
23) Die Babesie liegt in der Endphase der Auswanderung in einem von der Erythrozytenmembran gebildeten Sack, der sich hinter ihr zu schließen beginnt (Pfeile)

Der Neubefall von Erythrozyten muß naturgemäß unter schonenden Bedingungen vor sich gehen. Der Parasit drückt die Membran des roten Blutkörperchens nach innen ein, ohne daß es zu einer Ruptur kommt (Abb. 24). Vielmehr bildet sich eine Tasche, die den Parasiten enthält und die sich schließlich von der übrigen Wirtsmembran abschnürt.

Abb. 11a gibt einen pathogenetischen Hinweis. Sie zeigt einen parasitierten Erythrozyten, in dem die Babesie an der engsten Stelle ein Hindernis für eine weitere Komprimierung des Erythrozyten darstellt. Am Beispiel von Babesia gibsoni wird die geringe Verformbarkeit der Babesie vor Augen gestellt, die schließlich zu der bei Babesiosen gefürchteten Verstopfung der Blutkapillaren führen kann.

Abb. 24: Babesia gibsoni; Penetration eines Merozoiten in den Erythrozyten

IV. Besprechung der Ergebnisse

Nach Beobachtungen von SONDER und RODENWALDT (1910) kann eine latente Babesia canis-Infektion beim Hund durch die Splenektomie aktiviert werden. Bei den vorliegenden Untersuchungen wendeten auch wir dieses Verfahren an, um bei einem 4 Wochen zuvor mit Babesia canis infizierten Hund die Parasitämie zu reaktivieren. Nach Auftreten der ersten Parasiten wurden damit neue Hunde infiziert. Eine Steigerung der Parasitenanzahl bei diesen Hunden konnte durch die Splenektomie allerdings nicht erreicht werden; die klinischen Symptome verstärkten sich und führten schließlich zum Tod der Tiere. CIUCA (1912) erreichte dagegen mit einer 5 Tage p.i. durchgeführten Entmilzung ebenfalls beim Hund einen starken Anstieg der Parasitämie.

Trotz mehrfacher Versuche gelang es uns anfangs nicht, die Parasitämie der mit Babesia canis infizierten Hunde auf eine aussagekräftige Höhe zu bringen. SIMPSON, BILD und STOLIKER (1963) berichten, daß es ihnen auch erst nach der 8. Passage gelungen ist, bei splenektomierten Welpen eine Parasitämie von 1% zu erzeugen. BÜTTNER (1968) verwendete einen institutseigenen Laborstamm und berichtet, daß "fast alle Erythrozyten" befallen waren. Erst die Kombination von Splenektomie und schnell aufeinanderfolgenden Passagen von Hund zu Hund brachte uns schließlich auch eine Parasitämie von 1%, wobei die Gründe dafür eine eventuelle Virulenzsteigerung der Babesien, die große Befallsdichte der Einzelerythrozyten des Spenderblutes und die Herabsetzung der zellulären Immunität durch die Splenektomie sein können.

Die klinischen Erscheinungen der Hunde entsprechen den in der Literatur beschriebenen. Die Inkubationszeit der experimentellen Infektion von Babesia canis verkürzte sich mit zunehmender Anzahl der Passagen von 3 auf einen Tag. Bei den Untersuchungen von REUSSE (1954) und MAEGRAITH, GILLES und DEVAKUL (1957) betrug sie 2-7 bzw. 3-8 Tage.

Die von uns beobachteten schweren Atemwegsaffektionen der experimentellen Hundebabesiose mit Atemnot, Schaumaustritt aus den Nasenöffnungen und Lungenödem werden von MAEGRAITH, GILLES und DEVAKUL (1957) ebenfalls festgestellt. JACQUIER (1973) erwähnt sie allerdings bei seinen umfangreichen klinischen Beschreibungen von Hunden nach natürlicher Infektion nicht. Dieses weist darauf hin, daß bei passagierten Laborstämmen die Virulenz des Einzelerregers und seine pathogenen Eigenschaften größer sind als bei Feldstämmen oder daß sich bei natürlicher Übertragung zwischen Wirt und Parasit ein Gleichgewicht einpendelt, das den Hund vor schweren klinischen Schäden schützt.

Die Frage nach der Pathogenese der Organschädigungen bzw. des mengenmäßig hohen Auftretens befallener Erythrozyten im peripheren Blut läßt sich unseres Erachtens mit einer Verstopfung der Endkapillaren durch parasitierte Erythrozyten erklären. Wie wir zeigen konnten, wird die Verformbarkeit dieser Erythrozyten durch die Babesien derart gehemmt, daß eine Passage durch enge Gefäße behindert ist. Verstopfung, Ansammlung von babesienhaltigen Blutkörperchen und Sauerstoffmangel der zu versorgenden Organe sind die Folge davon. SHORTT (1973) tendiert zu der Auffassung, daß dieses aus einer Vergrößerung der Erythrozyten resultiere, wobei er allerdings weder Größenangaben macht noch an die starke Verformbarkeit der roten Blutkörperchen denkt.

Licht- und elektronenmikroskopisch konnten wir neben den sehr unterschiedlichen Lagen von Babesia canis und den meist peripher gelegenen Babesia gibsoni an Invasionsformen bzw. Formen beim Verlassen des Erythrozyten eine ausgesprochene randständige Lage erkennen. Wie GÖBEL, PATZIG und KRAMPITZ (1978) an Babesia microti feststellen, ist dieses einmal von dem Vorgang der Penetration abhängig, zum anderen aber auch von der Tatsache, daß sich die Parasiten über Zellbrücken nach außen ernähren können bzw. Stoffwechselendprodukte ausscheiden. Diese Vorgänge konnten zwar weder bei Babesia canis noch bei Babesia gibsoni so deutlich dargestellt werden, dennoch liegt aufgrund der bei ihnen auch vorhandenen multimembranösen Strukturen der Verdacht dafür nahe.

Die im Lichtmikroskop ermittelte Größe von Babesia canis mit 1,5-4 µm wird sowohl von HILL und BOLTON (1966) als auch von BÜTTNER (1968) in etwa bestätigt. In der Literatur werden paarweise liegende piriforme Babesien beim Hund als typisch für Babesia canis angegeben (ROKEY und RUSSELL, 1961). Merozoiten können aber auch einzeln oder in Vierteilungsform vorliegen. Junge Tochterzellen zeigen sich außerdem als kleine runde Knospen, die der Mutterzelle aufsitzen. Nach Teilungsvorgängen fanden wir bis zu 8 Parasiten in einem Erythrozyten; SHORTT (1973) gibt 16-18 Babesien als Höchstwert an.

Trophozoiten und Merozoiten von Babesia gibsoni lassen sich lichtmikroskopisch nicht mit Sicherheit unterscheiden. Birnenformen wurden zweimal beobachtet, auch FOWLER, RUFF und HORNOF (1970) wiesen sie in 1000 Ausstrichen nur 5mal nach. Ebenso wie BÜTTNER (1968) sowie KREIER und Mitarb. (1975) konnten wir weder in der Gefrierätzung noch in Ultradünnschnitten freiliegende Babesien vorfinden. Nach GLENN (1970) werden die im Lichtmikroskop extraerythrozytär liegenden Formen mechanisch freigesetzt. Gegen diese Annahme spricht allerdings die Tatsache, daß diese freien Formen in unseren Untersuchungen bei Babesia canis fast immer die für Merozoiten typische Birnenform besitzen. Elektronenmikroskopisch konnte auch RUDZINSKA (1976) feststellen, daß isolierte Babesien keine Invaginationen vorweisen.

Der Pellikula-Komplex der beiden Hundebabesien unterscheidet sich grundlegend. Bei Babesia canis konnten wir mit der Gefrierätzung den Befund von BÜTTNER (1968) bestätigen, daß Merozoiten sich durch einen 3-schichtigen Membrankomplex auszeichnen. Dieser Membranaufbau wird auch bei Merozoiten von Babesia herpailuri (GÖBEL und DENNIG, 1976) und Babesia microti Gray strain (KREIER und Mitarb., 1976; RUDZINSKA, 1976) beschrieben. Dabei besteht die äußere Hülle aus einer einfachen Elementarmembran. Sie wird in der Nomenklatur der Gefrierätzung nach DUBREMETZ und TORPIER (1978) als e-Membran bezeichnet. Der innere Membrankomplex besteht aus zwei miteinander verbundenen Elementar-

membranen, die stellenweise unterbrochen sind. Sie werden als m- (medial-) und i- (inner-) Membran bezeichnet.

In der Gefrierätzung werden Membranen nicht mit ihrer äußeren Oberfläche dargestellt, sondern aufgrund ihrer polaren Struktur in sich gespalten. DEAMER und BRANTON (1967) demonstrierten an Fettsäure-Doppelschichten, daß diese nach Gefrieren zwischen den Methylenden der Fettsäuremoleküle gespalten werden. Ebenso werden vermutlich biologische Membranen zwischen den Methylenden ihrer Phospholipide aufgespalten. Daraus resultieren zwei Flächen, die nach Gefrierätzung vorliegen können: die P-Fläche, die dem Cytoplasma zugewendet ist und die gegenüberliegende E-Fläche.

Auf diesen Flächen befinden sich verschieden große Granula in differierender Anzahl und Dichte. Den Nachweis ihres Proteincharakters erbrachte BRANTON (1971), indem er Erythrozyten-Schatten mit dem proteolytischen Enzym Pronase in unterschiedlicher Zeitdauer versetzte. Je länger das Enzym auf die Membran einwirkte, desto weniger Partikel waren auf der Oberfläche zu sehen.

Die Pe-Membran von Babesia canis-Merozoiten ist mit 17-20 nm großen Partikeln unregelmäßig besetzt, auf der Ee-Fläche sind sie 12-16 nm groß. Bei Babesia vesperuli der Katze und Babesia musculi der Maus beschreibt SÖBEL (1976) auf der äußeren Membran Partikel in etwa derselben Größe (120-128 Å) und Verteilung. Da diese beiden Babesienspezies auch in ihrer Gesamtgröße Babesia canis ähnlich sind, andererseits aber die kleinere Hundebabesie Babesia gibsoni mit einer Gesamtgröße von 0,7-1,5 µm auf der Pe-Schicht Partikel von 8 und 16 nm Größe trägt, scheint der Membranaufbau der Parasiten auch von ihrer Gesamtgröße abzuhängen. Weitere Größenvergleiche an anderen Babesienarten müßten allerdings noch zur Absicherung beitragen.

Bei Babesia canis zeigt die mittlere Membran auf der Em-Fläche eine feine Granulierung mit vereinzelten 7-8 nm großen Partikeln. Auch auf der Pm-Schicht sind sie selten, etwa halb so zahlreich wie auf der Ee-Membranfläche, und messen 8 nm. Ein Kükendrahtmuster, gebildet aus hexagonal angeordneten Partikeln, wie es AIKAWA (1967) und SEED und Mitarb. (1971) an Plasmodien, KREIER und Mitarb. (1975) an Babesia microti und GÖBEL (1976) an Babesia musculi darstellten, konnten wir an keiner Hundebabesie nachweisen.

Auf der Pi-Membran sind die Proteinpartikel in parallelen Reihen angeordnet, die in Längsrichtung des ovoiden Merozoiten verlaufen. Ihre Größe beträgt 15-17 nm. GÖBEL (1976) beschreibt in Reihen angeordnete Partikel an Babesia musculi als "unter dem Hals der Protrusionen" an Vermehrungsformen gelegen. Bei Sarcocystis tenella und Toxoplasma gondii stellen PORCHET und TORPIER (1977) ebenfalls parallele Partikel auf der gleichen Membran fest. Auch DUBREMETZ und TORPIER (1978) finden in ihren Untersuchungen an Eimeria nieschulzi diese Anordnung, wobei der Abstand zwischen den Reihen mit 30 nm angegeben wird. Bei Babesia canis ermittelten wir diesen mit 14 nm. Über die Funktion der speziellen Membranpartikelanordnung ist bisher nichts bekannt. Ebenso wie bei Eimeria nieschulzi konnten an Babesia canis transversale Unterbrechungen der parallelen Linien festgestellt werden. Die Partikelverteilung und -größe auf den Pi-Flächen von Babesia canis und Vertretern der Klasse Sporozoea kann gemeinsam mit dem 3-schichtigen Aufbau der Pellikula als charakteristisch für den Unterstamm der Apicomplexa angesehen werden.

Dieses Ergebnis, nach der Methode der Gefrierätzung erarbeitet, kann nur in Verbindung mit der Darstellung der Membranen nach Ultradünnschnitten gesehen werden, da nur so streng nach Merozoiten und Trophozoiten unterschieden werden kann.

Trophozoiten von Babesia gibsoni zeigen im Gegensatz zu Babesia canis zahlreichere und größere Invaginationen der Pellikula, eine Beobachtung, die generell größere und kleinere Babesien unterscheidet. So werden auch an Babesia herpailuri der Katze (GÖBEL und DENNIG, 1976) seltener Invaginationen gefunden als an der kleineren Babesia microti der Maus (RUDZINSKA, 1976). Da nach allgemeiner Ansicht diese Oberflächenvergrößerung der Pinocytose dienen (LANGRETH, 1976) und diese Flächen sogar bei Babesia microti noch durch extrazellulär gelegene multimembranöse Strukturen vergrößert werden (PATZIG, 1978), kann zumindest morphologisch auf eine hohe Stoffwechselrate geschlossen werden.

Merozoiten von Babesia canis und Babesia gibsoni unterscheiden sich weitgehend in der Ausbildung des Apikalkomplexes. Babesia canis zeigt nach unseren Untersuchungen sowie von BÜTTNER (1968) und BRENGELMANN (1977) diesen als typisch aufgebaut im vorderen Drittel des Merozoiten und mit dem der Rinderbabesie (POTGIETER und ELS, 1977a) als identisch. Auch Babesia ovis (FRIEDHOFF und SCHOLTYSECK, 1970) besitzt diese kennzeichnende Struktur, bestehend aus Polring, Rhoptrien, Mikronemen; der sphärische Körper ist nur gelegentlich anzutreffen und kömmt primär in den Zeckenformen vor. Bei Babesia gibsoni sind diese Organellen auch vorhanden, sie sind aber kleiner; Rhoptrien und Mikronemen sind über das gesamte Zytoplasma verteilt. Dieses wiederum ist nach Erkenntnissen an Babesia microti (PATZIG, 1978) für kleine und in ihrer Form mehr sphärisch ausgebildete Babesien charakteristisch. Alle weiteren Zellbestandteile, wie Kern, Ribosomen und endoplasmatisches Retikulum sowie atypische Mitochondrien zeigen bei Babesia gibsoni keine Besonderheiten.

Das Vorhandensein von rauhem und glattem endoplasmatischem Retikulum, wie bei Babesia canis (BÜTTNER, 1968), Babesia felis (DENNIG und HEBEL, 1969), Babesia herpailuri (GÖBEL und DENNIG, 1976) und Babesia microti (RUDZINSKA, 1976; PATZIG, 1978) beschrieben, kann auch von

uns an Babesia canis und Babesia gibsoni an Ultradünnschnitten festgestellt werden. Ribosomen, die für das rauhe endoplasmatische Retikulum kennzeichnend sind, lassen sich nach Gefrierätzung nicht darstellen (BRANTON, 1966), da Membranen, als Elementarmembran ausgebildet, immer an der Haftstelle der beiden Blätter auseinandergetrennt werden. Dabei spielt es keine Rolle, wo die Membranen liegen. Für das Spalten der Pellikula gilt das Prinzip genauso wie für das der Zytoplasmemembranen (BRANTON und Mitarb., 1975). Einen Nukleolus konnten wir nicht nachweisen, ebensowenig wie SIMPSON, BILD und STOLIKER (1963) bei Babesia canis und Babesia caballi sowie RUDZINSKA und TRAGER (1974a) bei Babesia microti. Dagegen fanden BÜTTNER (1968) einen Nukleolus bei Babesia canis sowie MOLYNEUX und BAFORT (1970) bei Babesia microti, FRIEDHOFF und SCHOLTYSECK (1968, 1969) wiesen ihn bei Babesia ovis und Babesia bigemina in der Überträgerzecke nach.

Babesia canis zeigt mit Zwei- oder Vierteilung einer Mutterzelle und anschließender Zellneubildung eine relativ geringe Reproduktionsrate. Auch mit der Methode der Gefrierätzung konnten keine anderen oder neuen Fakten in dieser Hinsicht geschaffen werden. Das dreidimensionale Bild läßt die für alle bekannten großen Babesien gültigen Verhältnisse erkennen. Die Merozoiten verbrauchen alle Bestandteile des Trophozoiten, wobei dieser schließlich nur noch als kleiner Rest an [illegible] (GRUNDMANN, 1977; PUTGIETER und ELS, 1977a). Bei kleineren Babesien, wie Babesia felis (DENNIG und HEBEL, 1969) und Babesia galagolata (GÖBEL und DENNIG, 1974), wurde von amöboiden Formen der Parasiten berichtet. Nach Ergebnissen an Ultradünnschnitten von Babesia microti (GÖBEL, PATZIG und KRAMPITZ, 1978) sowie Serienschnitten der gleichen Art (RUDZINSKA und TRAGER, 1977) handelt es sich dabei um Trophozoiten mit Pseudopodien. In diese Ausläufer wachsen Kernknospen der Mutterzelle hinein, und schließlich werden die jungen Merozoiten abgeschnürt. Mit Hilfe der Gefrierätzung können wir an Babesia gibsoni zeigen, daß es sich bei den Pseudopodien um echte Knospen handelt, die an der Kontaktstelle zum Trophozoiten eine Prädilektionsstelle zur Abtrennung aufweisen. Trotz

starker Vermehrung und Bildung von bis zu 9 solcher Knospen sind am Trophozoiten weder Degenerationserscheinungen noch Größenverlust zu erkennen. Diese Reproduktion verläuft nicht synchron wie bei Plasmodien, sondern in mindestens zwei Phasen ab (RUDZINSKA und TRAGER, 1977). Die abgesprengten Knospen sind offenbar beweglich und können jede für sich sofort nach Loslösung von der Mutterzelle den Erythrozyten verlassen. Hierin unterscheiden sie sich auch von den Plasmodien, bei denen alle neu gebildeten Merozoiten von einer gemeinsamen Hülle zusammengehalten werden.

Den Vorgang der Auswanderung oder Ausschleusung der Babesien konnten wir mit der Methode der Gefrierätzung an Babesia gibsoni darstellen. Nach dichter Anlagerung der Babesienpellikula an die Erythrozytenwand wird diese zunächst leicht, dann immer mehr nach außen vorgewölbt. Schließlich liegt die Babesie in einem von der Wirtsmembran gebildeten Sack außerhalb des roten Blutkörperchens. Bis hierhin entsprechen die Vorgänge denen der Penetration von Babesien beim Neubefall von Erythrozyten. Dabei wird nach Eindringen des Parasiten die Wand des Blutkörperchens geschlossen und die von ihr gebildete parasitophore Vakuole intraerythrozytär aufgelöst (RUDZINSKA und Mitarb., 1976). Bei der Ausschleusung konnten wir die beiden letzten Vorgänge nicht beobachten. Wir halten jedoch aufgrund des klinischen Bildes der Anämie und Hämoglobinurie eine Reparatur des Erythrozyten-Defektes nicht für wahrscheinlich. Die parasitophore Vakuole wird allem Anschein nach aufgelöst.

Der nach Gefrierätzung dargestellte Vorgang des Eindringens von Babesia gibsoni in das Blutkörperchen gleicht den von RUDZINSKA und Mitarb. (1976) an Babesia microti in Ultradünnschnitten beschriebenen Verhältnissen. Die Erythrozytenwand wird eingestülpt und bildet um den Parasiten eine parasitophore Vakuole. Diese wird aufgelöst, wohingegen sie nach LADDA, AIKAWA und SPRINZ (1969) bei Plasmodien erhalten bleibt und das äußere Blatt der Pellikula bildet. LYCKE, CARLBERG und NORRBY (1975) stellen auch bei Toxoplasma gondii eine Auf-

lösung der invaginierten Membran nach der Invasion fest, wobei dann allerdings eine neue Membran vom Parasiten gebildet wird. Babesien-Merozoiten besitzen beim Eindringen bereits einen kompletten 3-schichtigen Pellikularkomplex, der danach bei der Transformation in Trophozoiten um zwei Schichten verringert wird.

Die in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der Ultradünnschnitt- und Gefrierätztechnik erbrachten feinstrukturellen Ergebnisse lassen im Vergleich mit den diskutierten Verhältnissen bei anderen Babesienarten folgende wesentliche Punkte erkennen: Beide Arten unterscheiden sich insbesondere durch Anzahl und Verteilung der Makromoleküle auf den verschiedenen Membranschichten; des weiteren läuft der Vermehrungsvorgang bei Babesia gibsoni in Form einer Knospung ab, bei Babesia canis in Form einer Mehrfachteilung.

V. Zusammenfassung

Babesia canis und Babesia gibsoni wurden nach experimenteller Infektion von Beagle-Hunden an Gefrierätzungen und Ultradünnschnitten elektronenmikroskopisch untersucht.

Deutliche Unterschiede werden an den Membranen der beiden Babesienarten nach Gefrierätzung sichtbar. Bei Babesia canis ist je eine Membran der Pellikula (= etwa gleich große Proteinpartikeln besetzt, nämlich 17-20 nm auf der Pe-Fläche, 12-16 nm auf der Ee- und der Ei-Fläche und auf den mittleren Flächen (Pm, Em) 7-8 nm. Die Pi-Schicht zeigt Partikel von 15-17 nm Größe, die in parallelen Reihen liegen. Bei Babesia gibsoni befinden sich auf der äußeren Membran (Pe) große (16 nm) und kleine Partikel (8 nm), die unregelmäßig angeordnet sind.

An Ultradünnschnitten wird gezeigt, daß Babesia gibsoni für die Nahrungsaufnahme größere und mehr Invaginationen bildet als Babesia canis. Die Reproduktion von Babesia canis erfolgt durch Zwei- oder Vierteilung, wobei die Mutterzelle aufgelöst wird. Babesia gibsoni vermehrt sich durch Knospung, bei welcher der Trophozoit erhalten bleibt.

Auswanderung der Merozoiten aus dem Erythrozyten und Penetration bei Neubefall erfolgen unter Aus- bzw. Einstülpung der Erythrozytenmembran, wobei diese zur parasitophoren Vakuole wird.

Mundt, E.: Micromorphologic investigations on Babesia canis and Babesia gibsoni in the blood of experimentally infected dogs

Summary

After freeze-etching and ultrathin-sectionning Babesia canis and Babesia gibsoni were investigated in experimentally infected beagles.

Significant differences are between the membranes of both Babesia-species after freeze-etching. In the case of Babesia canis each membrane of the pellicle is covered by protein particles of about the same size: 17-20 nm on the Pe-face, 12-16 nm on the Ee- and Ei-face and 7-8 nm on the medium faces Pm and Em. The Pi-membrane shows particles of 15-17 nm lying in parallel rows. In case of Babesia gibsoni varying particles (16 nm, 8 nm) are irregularly arranged on the outer membrane.

Ultrathin-sections show that Babesia gibsoni form larger and more invaginations for pinocytosis than Babesia canis. Babesia canis reproduce by binary fission or by division in four daughter cells; the mother-cell disintegrates. Babesia gibsoni reproduce by budding, the trophozoit remains unchanged.

Merozoites leave the erythrocyte by evagination and in case of a re-infection invade it by invagination of the membrane of the erythrocyte which transforms into a parasitophorous vacuole.

VI. Literaturverzeichnis

AESCHLIMANN, A., M. BROSSARD und G. QUENET (1975): Contribution à la connaissance des piroplasms de Suisse. Acta Trop. 32, 281-289

AIKAWA, M. (1966): The fine structure of the erythrocytic stages of three avian malarial parasites, Plasmodium fallax, Plasmodium lophurae, Plasmodium cathemerium. Am. J. Trop. Med. Hyg. 15, 449-471

AIKAWA, M. (1967): Ultrastructure of the pellicular complex of Plasmodium fallax. J. Cell. Biol. 35, 103-113

ALPERIN, A.L., and N.F. BEVINS (1963): Babesiosis in a californiа dog. J. Am. Vet. Med. Ass. 143, 1328-1330

BAILENGER, J. und I. JAMIN (1968): Epidémiologie de la babesiose (piroplasmose) canine dans le sud-ouest de la France. Ann. Parasit. 43, 15

BOTROS, B.A., R.W. MOCH and J.P.BARSOUM (1973): Babesia canis in an egyptian balady dog. A case report. J. Egypt. Vet. Med. Ass. 33, 171-176

BRANTON, D. (1966): Fracture faces of frozen membranes. Proc. Nat. Acad. Sci. 55, 1048-1056

BRANTON, D. (1971): Freeze-etching studies of membrane structure. Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. 261, 133-138

BRANTON, D., S. BULLIVANT, N.B. GILULA, M.J. KARNOVSKY, H. MOOR, K. MÜHLETHALER, D.H. NORTHCOTE, L. PACKER, B. SATIR, P. SATIR, V. SPETH, L.A. STAEHELIN, R.L. STEERE and R.S. WEINSTEIN (1975): Freeze-etching nomenclature. Sci. 190, 54-56

BRENGELMANN, G. (1977): Die Blutform von Babesia canis im Hund. Mikromorphologie von Trophozoiten, Merozoiten und Intermediärformen vor und nach Therapie mit Oxopirvedine® und Berenil®. Vet. med. Diss., München

BRUMPT, E. (1938): Transmission de la souche francaise par la tique sud-africaine Haemaphysalis leachi. Ann. Parasit. 16, 97-116

BÜTTNER, D.W. (1968): Vergleichende Untersuchungen der Feinstruktur von Babesia gibsoni und Babesia canis. Z. Trop. Med. Parasit. 19, 330-342

CIUCA, A. (1912): Recherches sur l'influence de la splénectomie totale sur l'évolution de la piroplasme canine. Bull. Soc. Path. exot. 5, 143-150

CRESTIAN, J. und B. CLERC (1974): Piroplasmose canine avec complication oculaire. Rec. Med. Vet. 150, 403-406

DEAMER, D.W. and D. BRANTON (1967): Fracture planes in an ice-bilayer model membrane system. Science 158, 655-657

DENNIG, H.K. und R. HEBEL (1969): Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an zwei Babesia-Arten der Feliden. Z. Parasitenk. 32, 95-111

DUBREMETZ, J.F. and G.TORPIER (1978): Freeze-fracture study of the pellicle of an Eimerian sporozoite (Protozoa, Coccidia). J. Ultrastruct. Res. 62, 94-109

EWING, S.A. (1963): Observations on leucocytic inclusion bodies from dogs infected with Babesia canis. J. Am. Vet. Med. Ass. 143, 503-506

FLEWETT, T.H. and J.D. FULTON (1959): The relationship of Babesia rodhaini to the host erythrocyte. Ann. Trop. Med. Paras. 53, 501-503

FOWLER, J.L., M.D. RUFF and W.J. HORNOF (1970): Modification of Field's stain for examination of growth forms of Babesia gibsoni. Am. J. Vet. Res. 31, 1079-1083

FOWLER, J.L., M.D. RUFF, R.C. FERNAU and Y. FURUSHO (1972): Babesia gibsoni: Chemotherapy in dogs. Am. J. Vet. Res. 33, 1109-1114

FRIEDHOFF, K. und E. SCHOLTYSECK (1969): Fine structure of Babesia ovis trophozoites in Rhipicephalus bursa ticks. J. Parasit. 54, 1246-1250

FRIEDHOFF, K. (1969): Lichtmikroskopische Untersuchungen über die Entwicklung von Babesia ovis (Piroplasmidea) in Rhipicephalus bursa (Ixodidae). Z. Parasitenk. 32, 191-219

FRIEDHOFF, K. und E. SCHOLTYSECK (1969): Feinstrukturen der Merozoiten von Babesia bigemina im Ovar von Boophilus microplus und Boophilus decoloratus. Z. Parasitenk. 32, 266-283

FRIEDHOFF, K. und E. SCHOLTYSECK (1970): Feinstrukturen und Entwicklung erythrozytärer Stadien von Babesia bigemina, Babesia divergens und Babesia ovis. Z. Parasitenk. 34, 7

FRIEDHOFF, K., E. SCHOLTYSECK und G. WEBER (1972): Die Feinstruktur der differenzierten Merozoiten von Babesia ovis in den Speicheldrüsen weiblicher Zecken. Z. Parasitenk. 38, 132-140

FRIEDHOFF, K.T. (1974): The ultrastructure of the Piroplasmea. Proc. 3rd. Internat. Congr. Parasitol. München 1, 135-136

FRIEDHOFF, K.T. und G. BÜSCHER (1976): Rediscovery of Koch's "Strahlenkörper" of Babesia bigemina. Z. Parasitenk. 50, 345-347

FRIEDHOFF, K.T. (1976): Quantitative studies of Babesia infections in ticks. 2nd German-Japanese Cooperative Symposium on Protozoon Diseases, Bonn, 44-47

FRIEDHOFF, K. und A. LIEBISCH (1978): Piroplasmeninfektionen der Haustiere. Tierärztl. Prax. 6, 125-139

GEYER, S. und H.G. RATHELBECK (1976): Beitrag zur Babesiose des Hundes - 2 beobachtete Fälle einer "Urlaubserkrankung". Kleint. Prax. 21, 5-11

GILOT, B. (1974): Ecologie et role pathogène de Dermacentor reticulatus (Fabricius, 1874) (Ixodoidea) dans le sud-est de la France. Acarologia 16, 220-249

GLENN, B.L. (1970): Diagnosis of parasitic diseases in blood of small animals. J. Am. Vet. Med. Ass. 157, 1681-1685

GÖBEL, E. und H.K. DENNIG (1974): The ultrastructure of Babesia galagolata and Babesia musculi in erythrocytes of mice. Proc. 3rd Internat. Congr. Parasitol. München 1, 136-137

GÖBEL, E. und H.K. DENNIG (1976): Die Ultrastruktur der Trophozoiten und Merozoiten von Babesia herpailuri in Erythrozyten der Hauskatze nach Behandlung mit Imidocarb® (3,3'-Bis-2-imidazolin-2-yl)-carbanilid. Z. Parasitenk. 49, 97-112

GÖBEL, E. (1976): Ultrastrukturelle Untersuchungen zur Morphologie und Topographie von Babesien (B. musculi und B. herpailuri) nach Gefrierätzung. Z. Parasitenk. 50, 207

GÖBEL, E., F.M. PATZIG und H.E. KRAMPITZ (1978): Die Feinstruktur der intraerythrozytären Formen von Babesia microti (Stamm München und Thun) unter Berücksichtigung von Vermehrung und Ernährung der Parasiten. Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 91, 439-445

GONDER, R. und E. RODENWALDT (1910): Experimentelle Untersuchungen über Affenmalaria. Zentr. Bakt. I. Orig. 44, 236-240

GROGAN, J.W. (1953): Piroplasmosis in a dog. J. Am. Vet. Med. Ass. 123, 234

GROVES, M.G. und L.F. YAP (1968): Babesia gibsoni in a dog. J. Am. Vet. Med. Ass. 153, 689-693

GROVES, M.G. und G.L. DENNIS (1972): Babesia gibsoni: Field and laboratory studies of canine infections. Exp. Parasit. 31, 153-159

HEBEL, R. und H.K. DENNIG (1969): Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Babesia herpailuri nach Behandlung mit 4-4'-Diamidino-diazoaminobenzol (BERENIL^{R}) Z. Parasitenk. 33, 1-20

HILL, H.W.M. and B.L. BOLTON (1966): Canine babesiosis in Queensland. Aust. Vet. J. 42, 84-86

HOYTE, H.M.D. (1964): Electron microscope studies of Babesia bigemina, with particular reference to its mode of nutrition. Proc. 1st Intern. Congr. Parasit., Roma 1, 261-262

JACQUIER, C. (1967): Piroplasmose canine- 5 observations cliniques. Schw. Arch. Tierheilk. 109, 58-65

JACQUIER, C. (1973): Piroplasmose canine: Polymorphisme clinique. Schw. Arch. Tierheilk. 115, 121-129

JACQUIER, C. (1974): Piroplasmose canine, premier cas à Genève. Schw. Arch. Tierheilk. 116, 307-308

KOCH, R. (1906): Beiträge zur Entwicklungsgeschichte der Piroplasmen. Z. Hyg. 54, 1-9

KREIER, J.P., S.M. GRAVELY, T.M. SEED, R. SMUCKER and R.M. PFISTER (1975): Babesia sp.: The relationship of stage of development to structure of intra- and extracellular parasites. Tropenmed. Parasit. 26, 9-18

LADDA, R., M. AIKAWA and H. SPRINZ (1969): Penetration of erythrocytes by merozoites of mammalian and avian malarial parasites. J. Parasit. 55, 633-644

LANGRETH, S.G. and W. TRAGER (1975): Feeding mechanisms in extracellular Babesia microti and Plasmodium lophurae. J. Protozool. 22, 23A

LANGRETH, S.G. (1976): Feeding mechanisms in extracellular Babesia microti and Plasmodium lophurae. J. Protozool. 23, 215-223

LEEFLANG, P. (1971): De introductie van Babesiosis bij de hond in Nederland. Tijd. Diergeneesk. 96, 679-684

LEGER, M. und E. BEDIER (1922): Piroplasme du renard d'afrique, Fennecus dorsalis Gray. C.r.hebd. séanc. mém. Soc. biol. 87, 934-936

LEVINE, N.D. (1971): Taxonomy of the piroplasms. Trans. Am. Microsc. Soc. 90, 2-33

LEVINE, N.D. (1973): Protozoan parasites of domestic animals and of man. Burgess Publishing Comp., Minneapolis

LYCKE, E., K. CARLBERG and R. NORRBY (1975): Interactions between Toxoplasma gondii and its host cells: Function of the penetration-enhancing factor of Toxoplasma. Infection and Immunity 11, 853-861

MAEGRAITH, B., H.M. GILLES and K. DEVAKUL (1957): Pathological processes in Babesia canis infections. Z. Trop. Med. Parasit. 8, 485-514

MARONPOT, R.R. and E. GUINDY (1970): Preliminary study of Babesia gibsoni Patton in wild carnivores and domesticated dogs in Egypt. Am. J. Vet. Res. 31, 797-799

MEHLHORN, H. und E. SCHEIN (1976): Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Entwicklungsstadien von Theileria parva (Theiler, 1904) im Darm der Überträgerzecke Hyalomma anatolicum excavatum (Koch, 1844). Tropenmed. Parasit. 27, 182-191

MEHLHORN, H. and E. SCHEIN (1977): Electron microscopic studies of the development of kinetes in Theileria annulata Dshunkowsky & Luhs, 1904 (Sporozoa, Piroplasmea) J. Protozool. 24, 249-257

MEHLHORN, H., E. SCHEIN and M. WARNECKE (1978): Electron microscopic studies on the development of kinetes of Theileria parva Theiler, 1904 in the gut of the vector ticks Rhipicephalus appendiculatus Neumann, 1901. Acta Trop. 35, 123-136

MERENDA, J.H. (1939): Piroplasmosis in a french poodle. J. Am. Vet. Med. Ass. 95, 98-99

MOLYNEUX, D.H. and J.M. BAFORT (1970): The fine structure of Babesia microti in the natural host, Microtus agrestis. Z. Trop. Med. Parasit. 21, 393-401

PATTON, N.S. (1910): Preliminary report on a new piroplasm ("Piroplasma gibsoni" sp. nov.) found in the blood of the hounds of the Madras hunt and subsequently discoverd in the blood of the jackal "Canis aureus". Bull.Soc. Path.exot. 3, 274-284

PATZIG, F.M. (197?): Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen der Morphologie, Vermehrung und Ernährung von Babesia microti (Stamm München und Thun). Vet. med. Diss., München

PIANA, G.P. und B. GALLI-VALERIO (1895): Su di un infezione di cane non parassiti endoglobulari nel sangue. Moderno Zooiatro 9, 163

PORCHET, E. und G. TORPIER (1977): Etude du germe infectieux de Sarcocystis tenella et Toxoplasma gondii par la technique du cryodécapage. Z. Parasitenk. 54, 101-124

POTGIETER, F.T. and H.J. ELS (1977a): The fine structure of intraerythrocytic stages of Babesia bigemina. Onderstep. J. Vet. Res. 44, 157-168

POTGIETER, F.T. and H.J. ELS (1977b): Light and electron microscopic observations on the development of Babesia bigemina in larvae, nymphae and non-replete females of Boophilus decoloratus. Onderstep. J. vet. Res. 44, 213-232

PURCHASE, H.S. (1947): Cerebral babesiosis in dogs. Vet. Rec. 59, 269-270

RAO, A.N. (1927): Piroplasma gibsoni Patton, 1910. Ind. J. med. Res. 14, 785-800

REGENDANZ, P. und E. REICHENOW (1933): Die Entwicklung von Babesia canis in Dermacentor reticulatus. Arch. Prot. 79, 50-71

REUSSE, U. (1954): Zur Klinik und Pathologie der Hunde-Babesiose. Z. Trop. Med. Parasit. 5, 451-469

ROKEY, N.W. and R. RUSSEL (1961): Canine babesiosis (Piroplasmosis) - A case report. J. Am. Vet. Med. Ass. 138, 635-638

RUDZINSKA, M.A. and W. TRAGER (1962): Intracellular phagotrophy in Babesia rodhaini as revealed by electron microscopy. J. Protozool. 9, 279-288

RUDZINSKA, M.A. and W. TRAGER (1974a): The fine structure of intra-erythrocytic merozoites in Babesia microti. J. Protozool 21, 445

RUDZINSKA, M.A. and W. TRAGER (1974b): Intraerythrocytic reproduction in Babesia microti: An electron microscope study. J. Protozool. 21, 446

RUDZINSKA, M.A. (1976): Ultrastructure of intraerythrocytic Babesia microti with emphasis on the feeding mechanism. J. Protozool. 23, 224-233

RUDZINSKA, M.A., W. TRAGER, S.J. LEWENGRUB and E. GRUBERT (1976): An electron microscopic study of Babesia microti invading erythrocytes. Cell. Tiss. Res. 169, 323-334

RUDZINSKA, M.A. and W. TRAGER (1977): Formation of merozoites in intraerythrocytic Babesia microti: an ultrastructural study. Can. J. Zool. 55, 928-938

SCHEIN, E., H. MEHLHORN and W. VOIGT (1979): Electron microscopical studies on the development of Babesia canis (Sporozoa) in the salivary glands of the vector tick Dermacentor reticulatus. Acta. Trop., im Druck

SCHOLTYSECK, E., H. MEHLHORN and K. FRIEDHOFF (1970): The fine structure of the conoid of Sporozoa and related organisms. Z. Parasitenk. 34, 68-94

SCHOLTYSECK, E. und H. MEHLHORN (1973): Elektronenmikroskopische Befunde ändern das System der Einzeller. Nat. wiss. Rd. 26, 420-427

SCHREVEL, J. (1968): L'ultrastructure de la région antérieure de la grégarine Selenidium et son intérêt pour l'étude de la nutrition chez les Sporozoaires. J. Microscopie 7, 391-410

SEED, T.M., R. PFISTER, J. KREIER and A. JOHNSON (1971): Plasmodium gallinaceum: Fine structure by freeze-etch technique. Exp. Parasit. 30, 73-81

SEED, T.M., C.R. STERLING, M. AIKAWA and J. RABBEDGE (1976): Plasmodium simium: ultrastructure of erythrocytic phase. Exp. Parasit. 39, 262-276

SHORTT, H.E. and E.J. BLACKIE (1965): An account of the genus Babesia as found in certain small mammals in Britain. J. Trop. Med. Hyg. 68, 37-42

SHORTT, H.E. (1973): Babesia canis: The life cycle and laboratory maintenance in its arthropod and mammalian hosts. Int. J. Parasit. 3, 119-148

SIMPSON, C.F., C.E. BILD and H.E. STOLIKER (1963): Electron microscopy of canine and equine babesia. Am. J. Vet. Res. 24, 408-414

SIMPSON, C.F., W.W. KIRKHAM and J.M. KLING (1967): Comparative morphologic features of Babesia caballi and Babesia equi. Am J. Vet. Res. 28, 1693-1697

SYMONS, T.H. (1927): Tick-fever due to Piroplasma gibsoni Patton in a kennel of fox hounds in India. Ind.J.Med.Res. 14, 293-315

WEBER, G. und K. FRIEDHOFF (1969): Cytochemische Untersuchungen an Merozoiten von Babesia ovis und Babesia bigemina (Piroplasmidea) in der Zeckenhämolymphe. Z. Parasitenk. 32, 181-190

WILLEBERG, P. und P.K. KJAERGAARD (1973): Babesiose hos en hund in Danmark. Nord. Vet. Med. 25, 308-312

YAKIMOFF, L. und N.J. SCHOKHOR (1917): Maladies animales du Turkestan russe à parasites endoglobulaires. Bull. Soc. Path. exot. 10, 302-311.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. J. Boch danke ich für die freundliche Überlassung des Themas, den mir zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen im Institut.

Herrn Dr. E. Göbel danke ich besonders für seine wertvollen Anregungen und die jederzeit gern gewährte Anleitung bei der Anfertigung meiner Arbeit.

Frau H. Meyer danke ich für die hervorragende technische Hilfe und die Realisation des Membranmodells.

Lebenslauf

Am 3. November 1952 wurde ich in Cuxhaven geboren als Tochter des Pastors Theodor Mundt und seiner Ehefrau Ruth Mundt, geb. Fleischmann.

Von April 1958 bis März 1963 besuchte ich die Grundschule in Cuxhaven-Groden, anschließend wechselte ich auf das Gymnasium für Mädchen in Cuxhaven über. Im Februar 1967 verzogen wir nach Hamburg, wo ich im Dezember 1971 am Elise-Averdieck-Gymnasium die Reifeprüfung ablegte.

Zum Sommersemester 1972 erhielt ich die Zulassung zum Studium der Tiermedizin an der FU Berlin. Nach Abschluß des Physikums setzte ich das Studium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München fort. Hier legte ich im November 1977 das Staatsexamen ab.

Von April 1978 bis April 1979 war ich am Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie mit der Anfertigung der Dissertation beschäftigt.